

Aus dem Lehrstuhl für Chirurgie
Prof. Dr. Hans Jürgen Schlitt
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

**Inhibition von c-MET mit INC280 hemmt das Tumorwachstum und verbessert
die Wirksamkeit von Gemcitabin beim Pankreaskarzinom in einem
experimentellen Modell**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Franziska Brandes

2018

Aus dem Lehrstuhl für Chirurgie
Prof. Dr. Hans Jürgen Schlitt
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

**Inhibition von c-MET mit INC280 hemmt das Tumorwachstum und verbessert
die Wirksamkeit von Gemcitabin beim Pankreaskarzinom in einem
experimentellen Modell**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Franziska Brandes

2018

Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. dent. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Sven A. Lang
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Philipp Wiggermann
Tag der mündlichen Prüfung:	23.03.2018

MEINER FAMILIE

Zur Dissertation eingereichte Publikation

Diese Publikationsdissertation basiert auf folgender Veröffentlichung:

Targeting cMET with INC280 impairs tumour growth and improves efficacy of gemcitabine in a pancreatic cancer model

Brandes F, Schmidt K, Wagner C, Redekopf J, Schlitt HJ, Geissler EK, Lang SA.

BMC Cancer. 2015; 15:71. Doi:c10.1186/s12885-015-1064-9.

Epub 2015 Feb 19. Pubmed PMID 25884642

Impact factor 2015: 3,265

Der Impact Factor bezieht sich auf den Journal Citation Report 2015 laut ISI (Institute for Scientific Information; <http://isiknowledge.com/jcr>).

Hinweis:

Für die Dissertation wurden nur ausgewählte Graphiken verwendet. Weitere Graphiken können der Originalpublikation im Anhang entnommen werden.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
1.1	Pankreaskarzinom	9
1.2	c-MET	10
1.3	Resistenz gegenüber Chemotherapie	10
1.4	INC280	11
2	Zielsetzung der Arbeit	12
3	Material und Methoden	13
3.1	Zellkultur	13
3.2	Gemcitabin-resistente Tumorzellen	13
3.3	MTT-Test – 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid-Test	13
3.4	Migrationsanalysen	14
3.5	Western Blot	14
3.6	Real-Time PCR (RT-PCR)	15
3.7	ELISA – Enzyme-linked Immunosorbent Assay	15
3.8	Tierversuche	16
3.8.1	Subkutaner Modell	16
3.8.2	Orthotoper Modell	17
3.9	Immunhistochemie	18
3.10	Statistische Analyse	19
4	Ergebnisse	21
4.1	Einfluss der c-MET-Inhibition auf Pankreaskarzinomzellen <i>in vitro</i>	21
4.2	Effekte von INC280 auf Gemcitabin-resistente Tumorzelllinien <i>in vitro</i>	22
4.3	Modulation von Stromafaktoren in Pankreaskarzinomzelllinien <i>in vitro</i>	24
4.4	c-MET als Zielstruktur in Stromakomponenten (ECs, VSMCs) <i>in vitro</i>	25
4.5	Einfluss der c-MET-Inhibition auf Tumorwachstum <i>in vivo</i>	26
4.6	Kombination von c-MET-Inhibition und Gemcitabin <i>in vivo</i>	27
4.7	Überlebensvorteil durch c-MET-Inhibition in Kombination mit Gemcitabin	30
5	Diskussion	32
6	Zusammenfassung der Arbeit	37

7	Abkürzungsverzeichnis	39
8	Literaturverzeichnis.....	41
9	Anhang.....	45
9.1	Danksagung	45
9.2	Abdruck der Publikation	46

1 Einleitung

1.1 Pankreaskarzinom

Das duktale Adenokarzinom des Pankreas macht lediglich 3% aller Krebserkrankungen aus. Aufgrund seines aggressiven Wachstumsverhaltens ist es jedoch die vierthäufigste tumorbedingte Todesursache in Europa und den USA [1, 2]. Pankreaskarzinome werden oft erst in lokal fortgeschrittenen (locally advanced pancreatic cancer, LAPC) oder metastasierten Stadien diagnostiziert. Eine chirurgische Intervention als einzig kurative Therapieoption ist daher nur in etwa 10-20% der Fälle möglich [3]. Zum aktuellen Zeitpunkt gilt Gemcitabin allein oder in Kombination mit anderen Substanzen als systemische Therapie der Wahl bei fortgeschrittenen Tumoren [3, 4], nachdem es in mehreren Studien im Vergleich zu 5-FU (5-Fluorouracil) bessere Ergebnisse erzielt hatte. Mit Gemcitabin wird ein medianes Überleben von lediglich 5,6 Monaten und ein 1-Jahresüberleben von 18% (vs. 4,1 Monate bzw. 2% unter 5-FU) erreicht [5]. Die Therapie des Pankreaskarzinoms bietet somit weiterhin viel Optimierungspotential. Zuletzt erhielt die Kombination aus Gemcitabin und nab-Paclitaxel („nanoparticle albumin bound paclitaxel“), an Albumin-Nanopartikel gebundenes Paclitaxel, die Zulassung für die metastasierte Situation, nachdem die Kombinationstherapie in einer Phase-III-Studie eine Verlängerung des medianen Überlebens um 1,8 Monate gegenüber Gemcitabin mono aufweisen konnte [6]. Des Weiteren zeigte die Kombination aus 5-Fluorouracil, Leucovorin, Irinotecan und Oxaliplatin (FOLFIRINOX) eine Verlängerung des medianen Überlebens um 4 Monate gegenüber Gemcitabin. Beide Therapieregime weisen jedoch ein deutlich stärker ausgeprägtes Nebenwirkungsprofil auf, sodass sie nur bei einem ausgewählten Patientenkollektiv eingesetzt werden können [6, 7].

Im Vergleich zu anderen soliden Neoplasien, bei denen zielgerichtete Therapeutika inzwischen einen festen Bestandteil der Standardtherapie darstellen [8-11], konnte diesbezüglich beim Pankreaskarzinom in den letzten Jahren kein großer Fortschritt erreicht werden. In dieser Substanzgruppe hatte bisher einzig der Einsatz des „epidermal growth factor receptor“ (EGFR)-Inhibitors Erlotinib bereits 2007 in Kombination mit Gemcitabin eine Verlängerung des medianen Überlebens um 2 Wochen im Vergleich zu einer Gemcitabin-Monotherapie erbracht [12]. Folglich

besteht ein großer Bedarf an neuen, tumorbiologisch selektiveren Therapieoptionen zur Verlängerung des Patientenüberlebens beim Pankreaskarzinom.

1.2 c-MET

c-MET (auch HGFR, „hepatocyte growth factor receptor“) ist eine durch das Protoonkogen *MET* kodierte Rezeptortyrosinkinase (RTK). Sie und ihr Ligand HGF („hepatocyte growth factor“) werden hauptsächlich von Zellen epithelialen und mesenchymalen Ursprungs exprimiert. Sie spielen physiologischerweise eine wichtige Rolle bei der Organentwicklung während der Embryogenese sowie bei der Geweberegeneration und der Wundheilung beim Erwachsenen [13-15]. Durch Bindung von HGF an seinen Rezeptor c-MET werden diverse intrazelluläre Signalkaskaden, unter anderem der MAPK/ERK-, PI3K/Akt-, STAT3/5-Signalweg, aktiviert [16]. Erhöhte c-MET- und HGF-Expressionsniveaus sind in multiplen soliden Malignomen beschrieben [17] und mit einer schlechten Prognose assoziiert [18-22]. Zu einer aberranten c-MET-Signalaktivität kann es durch mehrere unterschiedliche Vorgänge kommen, beispielsweise durch Genamplifikation, aktivierende Mutationen, Überexpression oder auto- bzw. parakrine Liganden-vermittelte Stimulation. Außerdem interagiert c-MET mit diversen anderen Oberflächenrezeptoren wie z.B. EGFR [23, 24]. Diese pathologische Überexpression führt in einigen Malignomen, darunter auch das Pankreaskarzinom, zu einer Steigerung von Tumorwachstum, Migration und zur Sekretion angiogener Faktoren [25]. Ferner ist c-MET im Pankreaskarzinom als Marker für Tumorstammzellen („cancer stem cells“, CSC) beschrieben [26], sodass analog zu anderen soliden Tumoren eine Überexpression mit schlechterem Überleben assoziiert ist [27]. Das c-MET-Expressionsniveau korreliert mit dem TNM-Stadium, dem Lymphknotenstatus und selbst nach vollständiger chirurgischer Resektion mit dem Auftreten früher Fernmetastasierung [27, 28].

1.3 Resistenz gegenüber Chemotherapie

Die Therapie des Pankreaskarzinoms stellt aufgrund des schlechten Ansprechens auf konventionelle Chemotherapie und des daraus resultierenden geringen Überlebensvorteils weiterhin eine große Herausforderung dar. Dies beruht unter anderem auf einer hohen intrinsischen, d.h. primären Resistenz gegenüber

Chemotherapie sowie einer extrinsischen, d.h. nach wiederholten Therapiezyklen entwickelten, sekundären Resistenz [29].

Es wurde bereits für diverse solide Tumore ein Zusammenhang zwischen primärer und erworbener Resistenz gegenüber Chemotherapie und der Aktivierung des c-MET-Signalwegs dargestellt [30, 31]. Auch beim Pankreaskarzinom wird die Aktivierung der Tyrosinkinase c-MET als ein Mechanismus dieser Resistenzentwicklung bzw. deren Aufrechterhaltung gegenüber Chemotherapie interpretiert [29]. Aus diesem Grund könnte eine Inhibition der Zielstruktur c-MET die Sensitivität gegenüber Chemotherapie, insbesondere Gemcitabin, steigern [29, 32] und so einen vielversprechenden Ansatz für die antineoplastische Therapie dieser verheerenden Tumorentität darstellen.

1.4 INC280

INC280 [(auch bekannt als INCB028060); 2-fluoro-N-methyl-4-(7-(quinolin-6-ylmethyl)imidazo[1,2-b][1,2,4]triazin-2-yl)benzamide] ist ein oral verfügbarer, ATP-kompetitiver Inhibitor der RTK c-MET. Er ist relativ selektiv für c-MET, hat aber zusätzlich hemmende Effekte auf die positive Regulation von EGFR und zeigte in präklinischen Studien eine potente antineoplastische Wirkung [33, 34]. Zudem konnte in einer Phase-I-Dosisescalationsstudie eine tolerable Toxizität und eine vielversprechende, dosisabhängige Verminderung der c-MET-Phosphorylierung nachgewiesen werden [35]. Darüber hinaus gibt es verschiedene Phase-I- und II-Studien für Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren. Somit könnte eine Inhibition von c-MET mittels INC280 auch für das Pankreaskarzinom eine erfolgversprechende Therapieoption darstellen.

2 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss einer medikamentösen c-MET-Inhibition mit dem ATP-kompetitiven RTK-Inhibitor INC280 auf Tumorwachstum, Signaltransduktion, Motilität und Resistenzentwicklung im xenogenen und syngenem Pankreaskarzinommodell *in vitro* und *in vivo* zu bestimmen.

3 Material und Methoden

3.1 Zellkultur

Für unsere Experimente verwendeten wir die humanen Pankreaskarzinomzelllinien BxPC-3, MiaPaCa2, HPAF-II (American Type Culture Collection, Manassas, USA), L3.6pl (Dr. I. J. Fiedler, University of Texas M. D. Andersen Cancer Center, Houston, USA), die murine Zelllinie Panc02 (Prof. Schmitz, Universität Bonn) sowie humane Endothelzellen („endothelial cells“, ECs) und glatte Gefäßmuskelzellen („vascular smooth muscle cells“, VSMCs) (jeweils PromoCell, Heidelberg). Die Kultivierung der Tumorzellen (außer Panc02) erfolgte in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; PAA Laboratories, Cölbe) unter Zusatz von 15%igem fetalem Kälberserum („fetal calf serum“, FCS) bei einer 5% CO₂-Sättigung und einer Temperatur von 37°C im Brutschrank. Die Panc02-Zellen kultivierten wir in RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) unter Zugabe von 10% FCS. Das serumreduzierte Medium stellten wir mit 1%igem FCS her. Der c-MET-Inhibitor INC280 wurde freundlicherweise von Novartis Oncology (Basel, Schweiz) zur Verfügung gestellt. Dieser wurde für die *in vitro*-Versuche in Dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma-Aldrich, Taufkirchen) aufgelöst und in einer Dosierung von 100 bis 1000 nmol/l verwendet. Sofern nicht anders angegeben, verwendeten wir INC280 in einer Dosierung von 500 nmol/l. Zur Hypoxie-Imitierung wurde Deferoxamin (DFX, 100 µmol/l; Sigma-Aldrich, Taufkirchen) verwendet. Die Stimulation mit HGF erfolgte jeweils mit 50 ng/ml.

3.2 Gemcitabin-resistente Tumorzellen

Um Tumorzelllinien mit erworbener Resistenz gegen Gemcitabin *in vitro* zu erhalten, behandelten wir native MiaPaCa2-Zellen mit steigenden Konzentrationen Gemcitabin. Wir begannen die Behandlung mit einer Dosierung von 10 nmol/l Gemcitabin und steigerten bis zu 250 nmol/l. Diese Zellen wurden anschließend MiaPaCa2(G250) genannt.

3.3 MTT-Test – 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid-Test

Zur Analyse des Einflusses von INC280 auf das Tumorzellwachstum pipettierten wir Tumorzellen (1x10³/Loch) in 96-Loch-Platten (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) und

setzten diese steigenden INC-Konzentrationen (100, 500 und 1000 nmol/l) aus, jeweils in Vollmedium und serumreduziertem Medium +/- HGF (50 ng/ml). Vitale Zellen wandeln nach Zugabe den gelben Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT; Sigma-Aldrich, Taufkirchen) durch NADH-abhängige Reduktion in den blau-violetten Farbstoff Formazan um. Dieser wird durch Abstoppen der Reaktion mit DMSO sichtbar gemacht, welches die Zellen lysiert und das Formazan freisetzt. Nach 24, 48 bzw. 72 Stunden ermittelten wir diesen Farbumschlag und die sich zur Farbintensität proportional verhaltende Vitalität der Zellen mittels Spektralphotometer (Eppendorf, Hamburg) bei einer Wellenlänge von 590 nm.

3.4 Migrationsanalysen

Um den inhibitorischen Effekt von INC280 auf die Tumorzellmotilität zu ermitteln, führten wir Migrationsanalysen mit modifizierten Boyden-Kammern (Becton Dickinson Bioscience, Heidelberg) durch. Hierzu wurden die Tumorzellen in serumreduziertem Medium resuspendiert und in die inneren Einsätze (8 µm Porendurchmesser) pipettiert. Zusammen mit den chemotaktischen Substanzen HGF (50 ng/ml) und 15% FCS wurde INC280 (500 nmol/l) in die äußeren Kammern pipettiert. Nach 24 und 48 Stunden wurden die Tumorzellen fixiert und migrierte Zellen mit Diff-Quick Reagenz gefärbt (Behring, Newark, USA). Für die Migrationsanalysen mit ECs und VSMCs wählten wir eine Inkubationszeit von 6 Stunden. Zellen, die durch den Filter migrierten, wurden in 4 zufällig gewählten Feldern gezählt und die Durchschnittswerte der Felder berechnet.

3.5 Western Blot

Zum Nachweis tumorspezifischer, c-MET-getriggelter Signaltransduktionswege und deren Inhibition durch INC280 wurden Western Blots durchgeführt. Die Tumorzellen wurden hierfür vorher bei einer Zelldichte von 60-70% mit aufsteigenden Konzentrationen INC280 (100, 500, 1000 nmol/l) für 4 bzw. 24 Stunden in serumreduziertem Medium (1% FCS) kultiviert und anschließend für 15 Minuten mit HGF (50 ng/ml) stimuliert. Nach Lyse der Zellen mittels Lysepuffer (bestehend aus Ripa-B-Puffer, Proteininhibitor, Phenylmethylsulfonylfluorid und Natriumorthovanadat) und Zentrifugation zur Isolierung des Proteins, wurde dessen Konzentration

mittels Bradford-Methode mit Hilfe eines Kits (BioRad, München) photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm quantifiziert. Die Proteinproben (je 40 µg) wurden anschließend mit einer denaturierenden 10%igen Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) elektrophoretisch in ihre Elemente aufgetrennt und anschließend aus den Gelen auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Diese Membranen wurden zunächst mit Primärantikörpern gegen p-Akt^{Ser473}, Akt, p-ERK^{Thr202/Tyr204}, ERK, p-c-MET^{Tyr1349}, c-MET, p-FAK^{Tyr925}, FAK (jeweils Cell Signaling, Beverly, USA), HIF-1α (Novus Biologicals, Littleton, USA) und β-Actin (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, USA) inkubiert. Nach nachfolgender Inkubation mit den entsprechenden Sekundärantikörpern konnten diese mittels Chemilumineszenz (Amersham Bioscience, Piscataway, USA) sichtbar gemacht werden. Zur Detektion von HIF-1α wurden MiaPaCa2(G250)-Zellen über 24 Stunden mit INC280 (500 nmol/l) +/- DFX (100 µmol/l) inkubiert.

3.6 Real-Time PCR (RT-PCR)

Um den Einfluss des „*Multidrug Resistance Protein 1*“ (*MDR1*) auf die c-MET-Inhibition durch INC280 zu ermitteln, führten wir eine Real-Time PCR mit dem LightCycler® System (Roche, Basel, Schweiz) durch. Hierzu wurde die Gesamt-RNA mit Hilfe des TRIzol® Reagenz (Life Technologies, Darmstadt) isoliert, mit Ethanol gereinigt und durch reverse Transkription in „complementary DNA“ (cDNA) umgeschrieben. Als Primerpaare dienten die Sequenzen 5-TGGCCTTATTTTGGTTGT TGGTG und 3-ATCATTGGCGAGCCTGGTAGTC für die Amplifikation von *MDR1* und das Primerpaar 5'-GTAACCCGTTGAACCCCATTT und 3'-CCATCCAATCGGTAG TAGCG für 18s. Die PCR-Produkte wurden anschließend mittels Gelelektrophorese sichtbar gemacht.

3.7 ELISA – Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Zur Bestimmung des Einflusses von INC280 auf die Sekretion von „vascular endothelial growth factor A“ (VEGF-A) und „platelet derived growth factor subunit B“ (PDGF-B) wurden ELISAs durchgeführt. Hierfür wurden ELISA kits spezifisch für humanes VEGF-A (BioSource, Nivelles, Belgien) und humanes PDGF-B (Peprotech, Hamburg) verwendet. Pankreaskarzinomzellen (HPAF-II, L3.6pl, MiaPaCa2,

MiaPaCa2(G250)) wurden ausplattiert, für 24 Stunden +/- INC280 (500 nmol/l) inkubiert und mit DFX (100 µmol/l) stimuliert.

3.8 Tierversuche

Im Anschluss an die *in vitro*-Experimente verifizierten wir den inhibitorischen Effekt von INC280 *in vivo*. Hierfür führten wir verschiedene orthotope und subkutane syngene sowie xenogene Mausmodelle durch. Die Experimente wurden von der Tierkommission und der Ethikkommission der Universität Regensburg genehmigt. Die Mäuse wurden mit Leitungswasser und Trockenfutter zu fünft in Käfigen untergebracht, täglich gewogen und auf tumorspezifische Symptome untersucht.

Für die xenogenen Versuche verwendeten wir 8 Wochen alte, männliche athymische Nacktmäuse (BALB/c^{nu/nu}), für die syngen Experimente 8 Wochen alte, männliche C57BL/6-Mäuse (jeweils Charles River, Sulzfeld).

Zur Behandlung erhielten die Mäuse täglich um ca. 13 Uhr INC280 (10 mg/kg Körpergewicht (KG), sofern nicht anders angegeben) mittels oraler Gavagier-Sonde. Gemcitabin wurde zweimal pro Woche nachmittags als intraperitoneale (i.p.) Injektion appliziert (50 bzw. 100 mg/kg KG). Zum Auflösen von INC280 verwendeten wir *in vivo* eine Stammlösung aus 0,5% Methylcellulose und 0,1% Tween80 (Sigma-Aldrich, München). Diese verdünnten wir mit Wasser unter 1- bis 2-minütigem vortexen in einem 45°C Wasserbad. Die Konzentrationen der finalen Lösung betrugen 0,25% Methylcellulose und 0,05% Tween80.

3.8.1 Subkutanes Modell

Subkutane, syngene Modelle verwendeten wir zur Dosisfindung von Gemcitabin, dem systemischen Therapiestandard [3], sowie zur Behandlung lokal fortgeschrittener Tumore mit INC280 und Gemcitabin als Mono- bzw. Kombinationstherapie. Hierfür wurden jeweils ca. 1×10^5 Panc02-Zellen in die rechte Flanke von C57BL/6-Mäusen injiziert und die Mäuse anschließend randomisiert.

Ziel der Dosisfindungsstudie war es, eine Dosierung zu ermitteln, bei der das Tumorwachstum in unserem murinen Tumormodell verzögert, jedoch nicht verhindert wird, um möglichst die reale Situation beim Patienten abbilden zu können. Nach Tumorzellinjektion wurden die Tiere in eine Kontroll- und 2 Behandlungsgruppen (n= 5 Tiere/Gruppe) randomisiert. Die Mäuse der Behandlungsgruppen erhielten jeweils

zweimal pro Woche 50 mg/kg bzw. 100 mg/kg Gemcitabin i.p. ab Tag 8. Tumore der höher dosierten Behandlungsgruppe wurden am Ende des Experiments asserviert und die c-MET-Expression mittels Western Blot ermittelt.

In einem weiteren subkutanen Modell analysierten wir den Einfluss des c-MET-Inhibitors INC280 auf das Überleben in fortgeschrittenen Tumorstadien. Die Tiere wurden hierfür in 4 Gruppen randomisiert (n= 10/Gruppe). Um die klinische Situation zu imitieren, therapierten wir ab einer Tumorgroße von ca. 80 mm³ 20 Mäuse mit Gemcitabin i.p. (100 mg/kg zweimal pro Woche). Sobald Tumore eine Größe von ca. 300 mm³ erreichten, führten wir bei 10 dieser Mäuse eine zusätzliche Behandlung mit INC280 (10 mg/kg/d) durch. Zudem erhielten 10 bisher unbehandelte Mäuse INC280 (10 mg/kg/d). Der Versuch wurde beendet, sobald Tumore eine Größe von ca. 800 mm³ erreichten.

3.8.2 Orthotopes Modell

In verschiedenen xenogenen und syngen, orthotopen Modellen untersuchten wir den inhibitorischen Einfluss von INC280 sowie einer Kombinationsbehandlung aus INC280 und Gemcitabin auf c-MET. Nach Laparotomie wurden die jeweiligen Tumorzellen in den Pankreasschwanz injiziert und die Mäuse entsprechend randomisiert.

In einem ersten xenogenen Modell verwendeten wir humane L3.6pl-Zellen (1×10^6 Zellen) und randomisierten die BALB/c^{nu/nu}-Mäuse in 2 Behandlungs- und eine Kontrollgruppe (n= 8-12 Tiere/Gruppe). 7 Tage nach Tumorzellinjektion begannen wir mit der Behandlung. Die Mäuse der Behandlungsgruppen erhielten jeweils täglich 10 mg/kg bzw. 20 mg/kg INC280. Die Dosierungen beruhen auf von Liu *et al.* zuvor evaluierten Dosierungsschemata [28]. An Tag 28 wurde der Versuch beendet, Tumore exzidiert und gewogen und die Inzidenz von makroskopisch sichtbaren Leber- und Lymphknotenmetastasen evaluiert.

Diesen inhibitorischen Wachstumseinfluss von INC280 bestätigten wir in einem syngen Modell mit murinen Panc02-Tumorzellen ($2,5 \times 10^5$ Zellen). Die Mäuse wurden in 2 Gruppen randomisiert mit n= 7 Tiere/Gruppe. Wie im Vorversuch begannen wir die Behandlung an Tag 7. Die Behandlungsgruppe erhielt täglich 10 mg/kg INC280. Aufgrund des aggressiveren Wachstums der Panc02-Tumore wurde der Versuch bereits an Tag 21 beendet, nachdem Tiere der Kontrollgruppe erste

Anzeichen für ein fortgeschrittenes Tumorleiden aufwiesen. Die Tumore wurden reseziert, gewogen und die Mäuse auf das Vorliegen von makroskopisch sichtbaren Lymphknotenmetastasen und Aszites untersucht (unserer Erfahrung nach entwickeln Panc02-Zellen keine Lebermetastasen).

Überdies untersuchten wir den inhibitorischen Einfluss einer Kombinationsbehandlung aus INC280 und Gemcitabin (100 mg/kg zweimal wöchentlich) in einem syngenem Mausmodell. Für einen verlängerten Behandlungszeitraum reduzierten wir die Zahl der in den Pankreasschwanz injizierten Tumorzellen auf 1×10^5 . Die Mäuse wurden in 4 Gruppen randomisiert (2 Monotherapiegruppen, eine Kombinationstherapiegruppe und eine Kontrollgruppe mit $n = 7-9$ Tiere/Gruppe) und die Therapie an Tag 7 nach Tumorzellinjektion begonnen. An Tag 27 zeigten Mäuse der Kontrollgruppe schwerwiegende Zeichen der Tumorerkrankung, sodass der Versuch beendet wurde. Die Tumore wurden exziiert, gewogen und die Mäuse auf das Vorliegen von Fernmetastasen untersucht. Zudem asservierten wir Gewebe für immunhistochemische Analysen.

In Analogie zu dem zuvor beschriebenen, subkutanen Überlebensversuch führten wir ein entsprechendes orthotopes Überlebensmodell durch. Nach Injektion von 1×10^5 Panc02-Zellen in den Pankreasschwanz wurden die Mäuse erneut in 4 Gruppen randomisiert ($n = 10$ /Gruppe). Die Behandlung mit Gemcitabin (100 mg/kg zweimal pro Woche) wurde an Tag 10 begonnen, basierend auf den Ergebnissen des subkutanen Modells fügten wir ab Tag 20 INC280 (10 mg/kg/d) zur Therapie hinzu. Die Mäuse wurden getötet, sobald sie fortgeschrittene Tumorerkrankungszeichen aufwiesen.

3.9 Immunhistochemie

Vom paraffinierten und kryofixierten Tumorgewebe wurden Schnitte mit dem Mikrotom zur weiteren immunhistochemischen Aufarbeitung hergestellt.

Zur Bestimmung der Tumervaskularisierung führten wir CD31-Färbungen an Kryoschnitten durch. Dafür wurde das gefrorene Gewebe in kaltem Aceton und Chloroform fixiert, mit PBS („phosphate buffered saline“) gewaschen und mit dem primären Anti-CD31-Antikörper (1:50; Pharmingen, Heidelberg) sowie dem entsprechenden sekundären Antikörper (1:200, Alexa Fluor 488; Sigma-Aldrich, Taufkirchen) inkubiert. Die Antikörperbindungen wurden mittels 3,3'-Diaminobenzidin

sichtbar gemacht. Zur Auswertung wurden bei 20-facher Vergrößerung Aufnahmen aus 4 Abschnitten der Tumorschnitte angefertigt, diese mit Hilfe der ImageJ Software (Version 1.46r) in Graustufen überführt und ein Grenzwert für alle Schnitte festgelegt. Die Gefäßfläche wurde anschließend als Pixel/Gesichtsfeld ausgewertet.

Um die Tumorzellproliferation analysieren zu können, führten wir Ki-67-Färbungen an Paraffinschnitten durch. Hierfür wurden die Schnitte initial mit Xylol entparaffiniert und mit einer absteigenden Alkoholwaschreihe (Isopropanolol, 95%iger Ethanol, 70%iger Ethanol) und Citratpuffer (pH 6; Merck, Darmstadt) rehydriert. Anschließend erfolgte eine Blockierung endogener Peroxidasen mit Hilfe von H_2O_2 . Zum Schluss wurden die Tumorschnitte mit dem primären Ki-67-Antikörper (1:100; Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich) über Nacht inkubiert und nach Waschen mit TBS-Puffer („tris-buffered saline“) der sekundäre Antikörper (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, USA) hinzugefügt und mit 3,3'-Diaminobenzidin inkubiert. Negativkontrollen wurden durch Weglassen des primären Antikörpers durchgeführt. Die Ki-67-positiven Zellen zählten wir bei 20-facher Vergrößerung in jeweils 4 zufälligen Feldern pro Gewebeschnitt und ermittelten den Mittelwert.

Zur Beurteilung der Zellapoptose verwendeten wir die „TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling“-Methode (TUNEL; Promega Corp., Mannheim). Mit Hilfe dieser Methode werden bei der Apoptose entstehende DNA-Fragmente durch das Enzym TdT mit markierten Nukleotiden versehen. Diese werden anschließend mittels Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. Unter 20-facher Vergrößerung nahmen wir 4 Gesichtsfeldausschnitte auf und zählten die TUNEL-positiven Zellen. Der Mittelwert wurde ermittelt.

3.10 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von SigmaStat (Version 3.0). Zum Ausschluss signifikanter Ausreißer bei den *in vivo*-Experimenten führten wir den Grubb's test durch (www.graphpad.com). Zur Bestimmung der statistischen Signifikanz Tumor-assoziierten Variablen der *in vivo*-Versuche verwendeten wir den Mann-Whitney-U-Test für nicht parametrische Daten und die Varianzanalyse (ANOVA; „analysis of variance“) mit anschließendem Multiple Comparison Test nach Tukey für mehr als 2 Gruppen. Die *in vitro*-Daten wurden mit Hilfe des

Zweistichproben-t-Tests analysiert. Alle Ergebnisse werden als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss der c-MET-Inhibition auf Pankreaskarzinomzellen *in vitro*

Zu Beginn analysierten wir mittels Western Blot die Expression der RTK c-MET als Zielstruktur von INC280 in humanen Pankreaskarzinomzelllinien. Zudem ermittelten wir die Expression des Oberflächenrezeptors EGFR, für den eine nachweisliche Wechselwirkung mit c-MET besteht [23]. c-MET wurde von HPAF-II-, BxPC3- und L3.6pl-Zellen exprimiert, wohingegen MiaPaCa2-Zellen die Zielstruktur nicht nachweisbar exprimierten. EGFR war in allen Zelllinien nachweisbar.

Mit dem Wissen, dass die Zielstruktur c-MET exprimiert wird, bestimmten wir den Einfluss seines Inhibitors INC280 auf das Wachstum der Tumorzelllinien *in vitro*. MTT-Analysen wiesen eine leichte, jedoch signifikante, dosisabhängige Wachstumsinhibition der HPAF-II-Zelllinie lediglich unter Stimulation mit HGF auf, während konstitutiv kein Effekt nachweisbar war (Abb. 1A). In den anschließenden Migrationsanalysen zeigte sich, dass eine c-MET-Hemmung zu einer signifikanten Reduktion der HGF-induzierten Motilität führt; die konstitutive Migration der HPAF-II-Zellen blieb von dieser Inhibition jedoch unbeeinträchtigt (Abb. 1B). Schlussendlich ermittelten wir mittels Western Blot die Wirkung von INC280 auf die Aktivierung onkogener Signalwege (u.a. c-MET, Akt, ERK). Durch Inkubation von HPAF-II-Zellen mit INC280 (500 nmol/l) über 4 bzw. 24 Stunden blieb die konstitutive Phosphorylierung von Akt, ERK und FAK unbeeinträchtigt. Unter diesen Bedingungen war ebenso wenig eine konstitutive Phosphorylierung von c-MET nachweisbar. Eine 15-minütige Stimulation mit HGF hingegen führte zu einer Phosphorylierung von c-MET, Akt, ERK und FAK. Durch vorherige Behandlung mit INC280 wurde dieser Effekt vollständig aufgehoben (Abb. 1C).

Die beschriebenen Daten konnten sowohl in der humanen Pankreaskarzinomzelllinie L3.6pl (Abb. 1D) als auch in der murinen Panc02-Zelllinie reproduziert werden. Insgesamt demonstrieren unsere Ergebnisse, dass eine Behandlung mit INC280 das HGF-getriggerte Wachstum, die Motilität und die onkogene Signalübertragung in Pankreaskarzinomzellen wirksam hemmt.

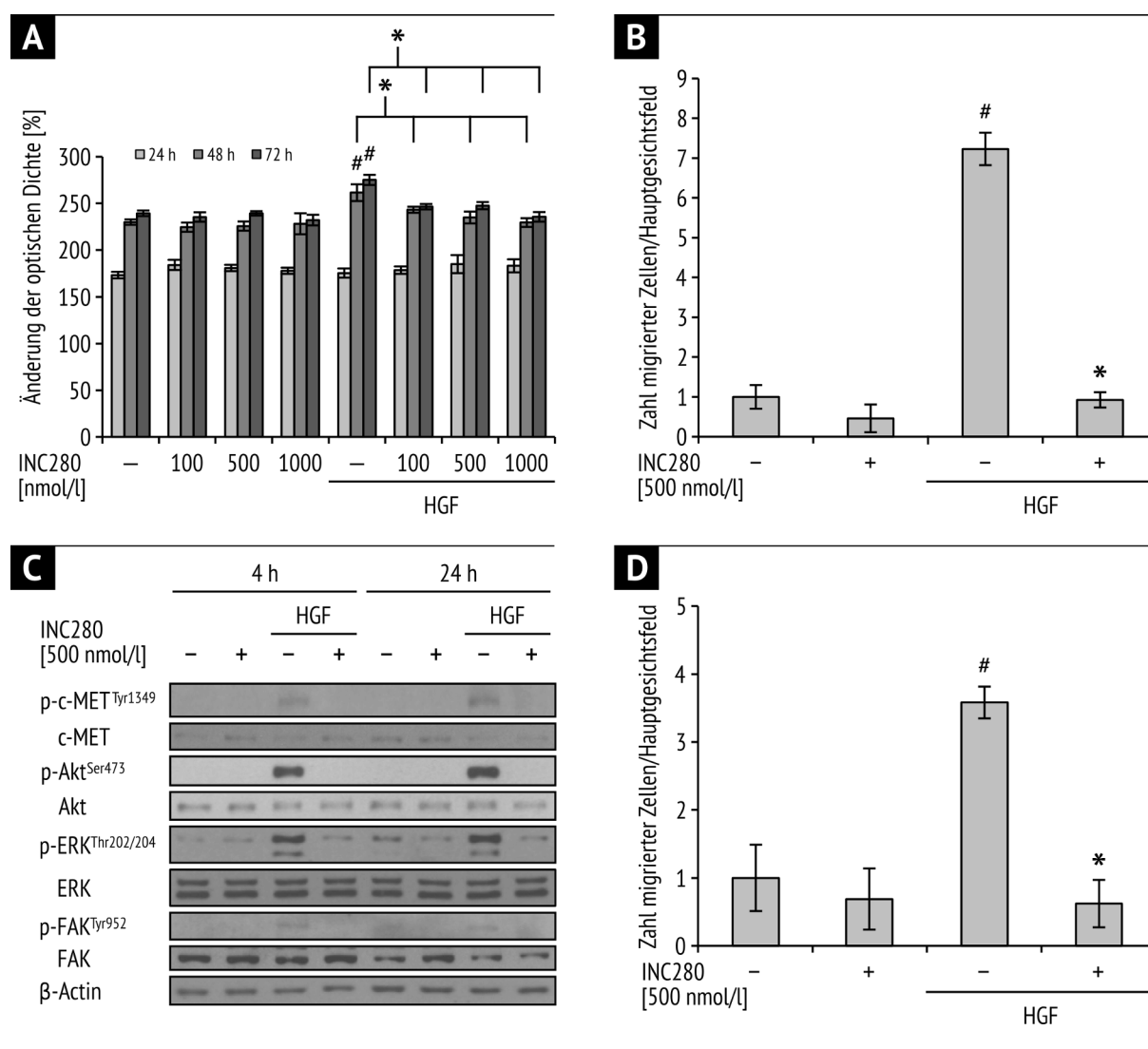


Abb. 1 Exemplarischer Auszug einiger *in vitro*-Daten anhand von HPAF-II **A)** MTT-Analyse; HGF-induzierte Wachstumssteigerung nach 48 und 72h, die durch INC280 signifikant gehemmt wird (# und * $p < 0.05$). **B)** Migrationsanalyse; signifikante Reduktion der HGF-induzierten Motilität nach Behandlung mit INC280 (# und * $p < 0.05$). **C)** Western Blot; Aktivierung onkogener Signalwege durch HGF. Dieser Effekt wird durch INC280 vollständig aufgehoben. **D)** Migrationsanalysen mit L3.6pL-Zelllinie; motilitätshemmende Wirkung von INC280 reproduzierbar (# und * $p < 0.05$). A, B, D) Fehlerbalken: Standardfehler des Mittelwerts. Die Stimulation mit HGF erfolgte jeweils mit 50 ng/ml.

4.2 Effekte von INC280 auf Gemcitabin-resistente Tumorzelllinien *in vitro*

Die Pankreaskarzinomzelllinie MiaPaCa2 weist eine gewisse natürliche Resistenz gegenüber Gemcitabin auf [5]. Um diese Resistenz zu verstärken, stimulierten wir MiaPaCa2-Zellen mit steigenden Konzentrationen Gemcitabin (10 - 250 nmol/l) und verwendeten die mit 250 nmol/l vorbehandelten MiaPaCa2-Zellen für die weiteren Versuche (genannt MiaPaCa2(G250)). Zunächst verglichen wir die nativen

MiaPaCa2-Zellen (im Folgenden MiaPaCa2(par) genannt) mit den MiaPaCa2(G250) bezüglich der Expression von c-MET. Interessanterweise wiesen die MiaPaCa2(par)-Zellen keine c-MET-Expression auf; MiaPaCa2(G250)-Zellen hingegen exprimierten ein starkes c-MET-Signal sowie ein diskret gesteigertes EGFR-Signal. Anschließend wurden beide Zelllinien hinsichtlich der inhibitorischen Eigenschaften von INC280 untersucht. In MTT-Analysen sprachen MiaPaCa2(par) aufgrund des fehlenden c-MET-Rezeptors wie erwartet nicht auf eine HGF-Stimulation und folglich auch nicht auf eine c-MET-Inhibition durch INC280 an (Abb. 2A). Im Gegensatz dazu führte eine Stimulation mit HGF bei MiaPaCa2(G250) zu einer starken Wachstumsinduktion, die durch INC280 signifikant, jedoch dosisunabhängig gehemmt wurde (Abb. 2B). In Migrationsanalysen konnten wir bei den MiaPaCa2(par)-Zellen lediglich eine tendenziell gesteigerte Motilität durch HGF-Induktion nachweisen. INC280 (500 nmol/l) hatte weder auf die konstitutive noch auf die HGF-induzierte Motilität Einfluss. Anders verhielt es sich bei den MiaPaCa2(G250)-Zellen: hier führte eine Stimulation mit HGF zu einer mehr als 6-fachen Steigerung der Motilität, die durch c-MET-Inhibition signifikant gehemmt werden konnte. Western Blots mit MiaPaCa2(par) wiesen bloß eine moderate Phosphorylierung von Akt und ERK nach HGF-Stimulation auf. INC280 (500 nmol/l) hob diesen Effekt für ERK auf, bei Akt zeigte sich jedoch nur eine geringe Abschwächung. In den resistenten MiaPaCa2(G250)-Zellen führte die Stimulation mit HGF hingegen zu einer ausgeprägten Phosphorylierung von Akt, ERK und FAK, welche durch Behandlung mit INC280 (500 nmol/l) stark inhibiert wurde (Abb. 2C). Abschließend untersuchten wir die Expression von *MDR1* als möglichen Zytostatikaresistenzmediator [36, 37]. Interessanterweise exprimierten native MiaPaCa2(par) keine *MDR1*-mRNA im Gegensatz zu resistenten MiaPaCa2(G250). In diesen Zellen wurde die *MDR1*-mRNA-Expression stark durch Stimulation mit dem Hypoxie-imitierenden DFX induziert und durch anschließende Behandlung mit INC280 signifikant reduziert. Passend hierzu konnten wir auf der Suche nach Mechanismen der *MDR1*-Regulation mittels Western Blot nachweisen, dass die Expression von „hypoxia-inducible factor 1-alpha“ (HIF-1 α), einem Hauptregulator von *MDR1* und Stromafaktoren wie VEGF-A, durch c-MET-Inhibition in MiaPaCa2(G250)-Zellen herunterreguliert wird. Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse vermuten, dass eine gesteigerte c-MET-Expression eine Rolle in der Resistenzentwicklung gegenüber Gemcitabin spielt.

Diese in Gemcitabin-resistenten Zellen beobachtete Überexpression kann durch INC280 wirksam inhibiert werden.

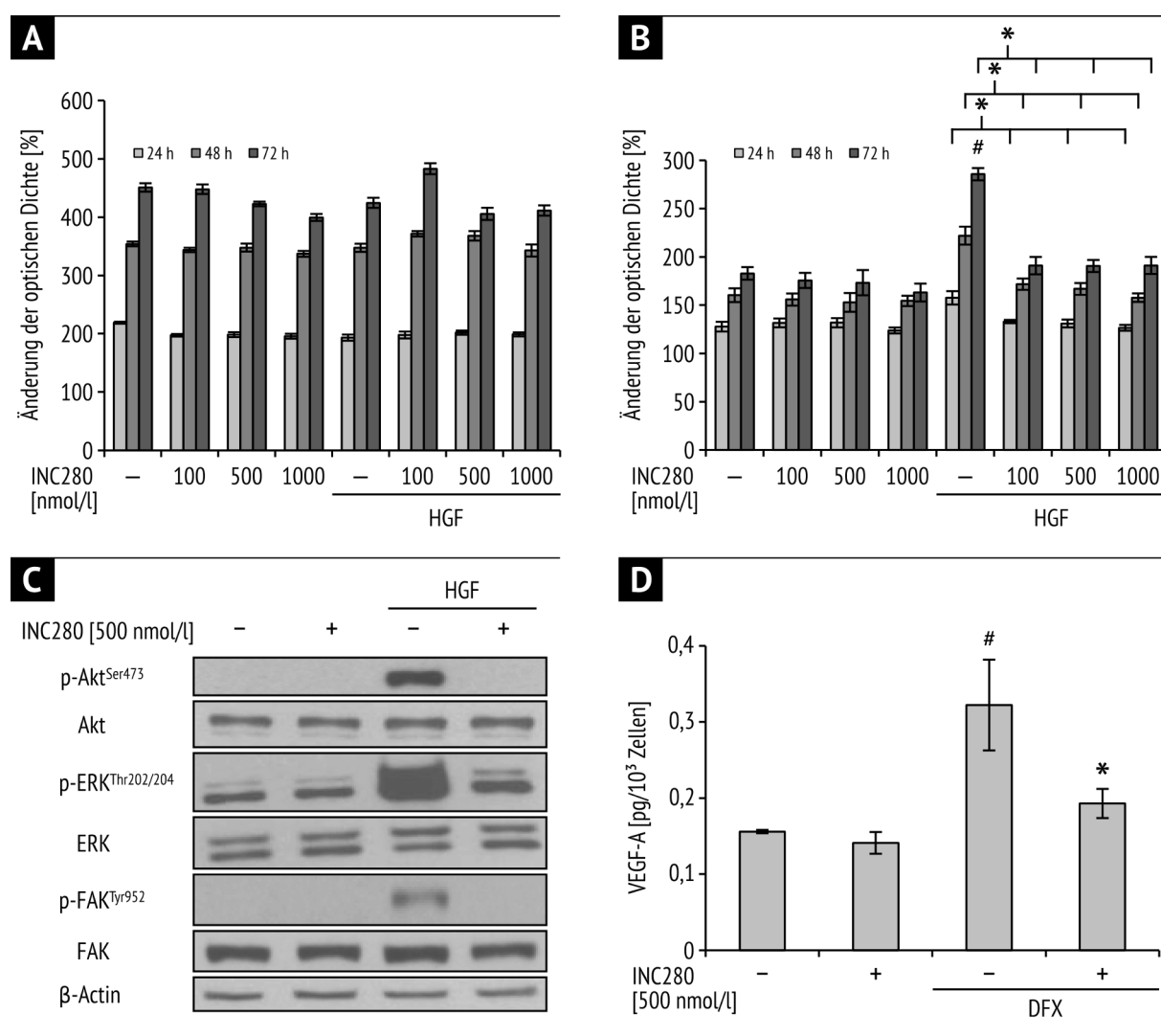


Abb. 2 Gemcitabin-resistente Tumorzellen (MiaPaCa2(G250)) **A)** MTT-Analyse MiaPaCa2(par); native MiaPaCa2-Zellen bleiben von Stimulation mit HGF unbeeinflusst, folglich auch von c-MET-Inhibition durch INC280. **B)** MTT-Analyse MiaPaCa2(G250); starke Wachstumsinduktion durch HGF, die durch INC280 signifikant gehemmt wird (# und * $p < 0.05$). **C)** Western Blot; HGF-induzierte Phosphorylierung onkogener Signalwege wird durch INC280 deutlich gehemmt. **D)** ELISA; starke Induktion der VEGF-A-Sekretion durch DFX, die durch INC280 signifikant gehemmt wird (# und * $p < 0.05$). A, B, D): Fehlerbalken: Standardfehler des Mittelwerts. HGF wurde in einer Dosierung von 50 ng/ml verwendet.

4.3 Modulation von Stromafaktoren in Pankreaskarzinomzelllinien *in vitro*

Tumorzellen stellen eine wichtige Quelle für Stromafaktoren dar, die das Mikromilieu beeinflussen [38]. Vor diesem Hintergrund untersuchten wir, ob durch eine Blockade

von c-MET die VEGF-A- und PDGF-B-Sekretion in Pankreaskarzinomzellen moduliert wird. In durchgeführten ELISAs für VEGF-A und PDGF-B blieb die Sekretion der beiden Wachstumsfaktoren in der HPAF-II- und L3.6pl-Zelllinie von der c-MET-Hemmung unbeeinflusst. Selbst nach Stimulation mit DFX zeigte sich kein Effekt. Interessanterweise konnte eine vermehrte VEGF-A- und PDGF-B-Sekretion in MiaPaCa2(G250) gegenüber MiaPaCa2(par) ermittelt werden. Nichtsdestotrotz hatte INC280 keinen Einfluss auf die konstitutive Sekretion der beiden Wachstumsfaktoren sowohl in MiaPaCa2(par) als auch in MiaPaCa2(G250). Dies lässt vermuten, dass andere, c-MET-unabhängige Mechanismen diese Hochregulierung beeinflussen.

Abschließend untersuchten wir den Einfluss der c-MET-Inhibition auf das Sekretionsniveau von VEGF-A und PDGF-B in Gemcitabin-resistenten, DFX-stimulierten MiaPaCa2(G250). In diesen Zellen hatte INC280 bereits zu einer signifikanten Hemmung von HIF-1 α geführt. Die Ergebnisse zeigten eine starke DFX-induzierte Steigerung der VEGF-A-Sekretion, die anschließend durch c-MET-Blockade signifikant gehemmt wurde (Abb. 2D). Die Inkubation mit DFX führte außerdem zu einer signifikanten Steigerung der Proteinsekretion von PDGF-B in diesen Zellen, welche von der Behandlung mit INC280 jedoch unbeeinflusst blieb.

Zusammenfassend demonstrieren diese Ergebnisse, dass eine Modulation der Zielstruktur c-MET in Pankreaskarzinomzellen keinen Einfluss auf die Sekretion von VEGF-A und PDGF-B hat; dennoch ist es möglich, dass die Sekretion von VEGF-A in Gemcitabin-resistenten Zellen durch c-MET-Blockade über eine Inhibition von HIF-1 α beeinflusst wird.

4.4 c-MET als Zielstruktur in Stromakomponenten (ECs, VSMCs) *in vitro*

Das Pankreaskarzinom wird histologisch maßgeblich durch eine starke Stromakomponente charakterisiert [38]. Aus diesem Grund untersuchten wir den Einfluss der c-MET-Blockade auf Endothel- und glatte Gefäßmuskelzellen (ECs und VSMCs). MTT-Analysen in ECs zeigten unter serumreduzierten Bedingungen und nach Stimulation mit HGF eine leichte, jedoch signifikante Wachstumszunahme, die durch INC280 dosisunabhängig aufgehoben wurde. Unter konstitutiven Bedingungen blieben die Zellen von INC280 unbeeinträchtigt. In Migrationsanalysen konnten wir eine signifikante Induktion der Motilität unter HGF-Stimulation nachweisen, die durch INC280 entsprechend gehemmt wurde. Mittels Western Blot untersuchten wir die

Aktivierung onkogener Signalwege in diesen Zellen. Eine Behandlung mit INC280 führte zu einer starken Inhibition der HGF-induzierten Aktivierung von Akt und ERK, wohingegen kein Einfluss auf die konstitutive Phosphorylierung beider Proteine zu beobachten war. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass INC280 Endothelzellen unter HGF-Stimulation beeinflussen kann.

Im Anschluss untersuchten wir die Wirkung von INC280 auf VSMCs. In MTT-Analysen zeigte sich unter konstitutiven Bedingungen ab 100 nmol/l eine dosisabhängige Wachstumsinhibition der Zellen. Im Gegensatz zu den ECs hatte eine Stimulation mit HGF unter serumreduzierten Bedingungen keinen Einfluss auf das Wachstum der VSMCs. Demzufolge beeinträchtigte auch die Behandlung mit INC280 diese Zellen nicht. In Migrationsanalysen mit VSMCs konnte durch Inkubation mit HGF keine Steigerung der Motilität nachgewiesen werden. INC280 hatte hier jedoch bereits auf die konstitutive Motilität der Gefäßmuskelzellen einen hemmenden Effekt. Zuletzt führten wir Western Blot-Analysen durch. Hinsichtlich der inhibitorischen Eigenschaften von INC280 zeigte sich kein Einfluss auf die konstitutive Phosphorylierung von Akt und lediglich ein geringer Effekt auf die Phosphorylierung von ERK. Somit lässt sich schlussfolgern, dass VSMCs von einer Stimulation durch HGF unbeeinflusst bleiben und INC280 folglich nur einen vernachlässigbaren Effekt auf diese Zellen hat.

4.5 Einfluss der c-MET-Inhibition auf Tumorwachstum *in vivo*

Unsere bisherigen Ergebnisse lassen vermuten, dass eine INC280-getriggerte c-MET-Inhibition effektiv gegen Pankreastumorzellen ist. Um die *in vitro* gewonnenen Ergebnisse zu bestätigen und zu vertiefen, führten wir zunächst ein orthotopes, xenogenes Mausmodell mit metastasierenden L3.6pl-Tumorzellen durch. Um potentielle dosisabhängige Effekte zu ermitteln, begannen wir 7 Tage nach Tumorzellimplantation mit der INC280-Behandlung in 2 verschiedenen Dosierungen (10 und 20 mg/kg/d). Nach 28 Tagen wurde der Versuch beendet. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion des finalen Tumorgewichts in beiden Behandlungsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe, jedoch ohne Unterschied zwischen den beiden Behandlungskollektiven (Abb. 3A). Wir legten daher für die Folgeversuche 10 mg/kg/d als Behandlungsdosis fest. Zusätzlich zeigte sich ein nicht signifikanter Trend zu einer reduzierten Lebermetastasierung durch c-MET-Inhibition.

Bei 67% (8/12 Mäusen) der Kontrollgruppe konnten Lebermetastasen nachgewiesen werden im Vergleich zu 50% (5/10 bzw. 4/8 Mäusen) in den Behandlungsgruppen (Tab. 1). Ähnliche Ergebnisse erhielten wir in Hinblick auf vergrößerte Lymphknoten: In der Kontrollgruppe wiesen 67% (8/12 Mäusen) vergrößerte Lymphknoten auf im Gegensatz zu 30% (3/10 Mäusen; 10 mg/kg/d) bzw. 25% (2/10 Mäusen; 20 mg/kg/d) in den jeweiligen Behandlungsgruppen. Eine statistische Signifikanz wurde dabei nicht erreicht (Tab. 1). Dennoch ist dieser Trend von Bedeutung, da Lymphknoten den primären Metastasierungsweg beim Pankreaskarzinom darstellen [39, 40]. Um den inhibitorischen Einfluss von INC280 auf das Tumorwachstum zu bestätigen, führten wir anschließend ein orthotopes, syngenes Modell mit murinen Panc02-Tumorzellen durch. Wie im vorherigen xenogenen Modell zeigte sich auch hier ein durch c-MET-Inhibition signifikant vermindertes Tumorwachstum an Tag 21 sowie ein Trend zu reduzierter lymphogener Metastasierung (Tab. 1). Zudem konnte bei keiner der mit INC280 behandelten Mäuse Aszites nachgewiesen werden, wohingegen 57% (4/7 Mäusen) der Kontrollgruppe Aszites aufwiesen (Tab. 1). Lebermetastasen wurden nicht detektiert, da murine Panc02-Zellen unserer Erfahrung nach nach orthotoper Implantation in das Pankreas keine Lebermetastasen bilden. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass eine Inhibition von c-MET durch INC280 zu einer Reduktion des Tumorwachstums und zumindest tendenziell der Metastasenbildung *in vivo* führt.

4.6 Kombination von c-MET-Inhibition und Gemcitabin *in vivo*

Gemcitabin stellt den therapeutischen Standard in der Behandlung von Pankreaskarzinompatienten dar [3, 4]. Aufgrund dessen evaluierten wir eine Kombinationsbehandlung aus INC280 und Gemcitabin *in vivo*. Wir führten zunächst einen subkutanen, syngenem Gemcitabin-Dosiseskalationsversuch mit Panc02-Zellen durch. Um möglichst die klinische Situation widerzuspiegeln, ermittelten wir eine Dosis mit nur limitierter therapeutischer Wirkung. Eine Konzentration von 50 mg/kg bzw. 100 mg/kg Gemcitabin i.p. zweimal wöchentlich appliziert führte zu einer Verzögerung des Tumorwachstums, nicht jedoch zu einer vollständigen Inhibition in diesem Modell (Abb. 3B). In Western Blot-Analysen dieser Tumore zeigte sich eine deutliche Hochregulierung der c-MET-Expression nach Behandlung mit Gemcitabin (Abb. 3C). Für weitere Versuche verwendeten wir Gemcitabin in einer Dosierung von

100 mg/kg in Kombination mit INC280 (10 mg/kg/d). Die Wirksamkeit dieser Kombination ermittelten wir zuerst in einem orthotopen, syngenem Mausmodell (Panc02). 7 Tage nach Tumorzellinjektion begannen wir die Behandlung mit INC280, Gemcitabin oder einer Kombination aus beiden und setzten diese für 20 Tage fort. Es traten keine Therapie-assoziierten Nebenwirkungen auf. Alle Behandlungsgruppen zeigten eine signifikante Reduktion des finalen Tumorgewichts. Die Kombinationstherapie manifestierte sich dennoch als effektivste Therapie und wies eine signifikante Reduktion des Tumorgewichts sowohl gegenüber der Kontroll- als auch gegenüber den beiden Monotherapiegruppen auf (Abb. 3D). Wie in den Vorversuchen untersuchten wir auch diese Mäuse auf mögliche Metastasen. Unter der Kombinationstherapie mit INC280 und Gemcitabin zeigte sich eine signifikant reduzierte Bildung von Lymphknotenmetastasen (12,5%, 1/8 Mäusen) gegenüber der Kontrollgruppe (67%, 6/9 Mäusen; Tab. 1). Aszites war in der kombinierten Therapiegruppe hingegen gar nicht nachweisbar (im Vergleich zu 33% in der Kontrollgruppe; Tab. 1).

Orthotopes L3.6pl-Modell¹

	Lebermetastasen		LK-Metastasen	
	positiv	negativ	positiv	negativ
Kontrolle (n=12)	8 (66.7%)	4 (33.3%)	8 (66.7 %)	4 (33.3%)
INC280 10 mg/kg/d (n=10)	5 (50%)	5 (50%)	3 (30%)	7 (70%)
INC280 20 mg/kg/d (n=8)	4 (50%)	4 (50%)	2 (25%)	6 (75%)

Orthotopes Panc02-Modell²

	LK-Metastasen		Aszites	
	positiv	negativ	positiv	negativ
Kontrolle (n=7)	4 (57.1%)	3 (42.9%)	4 (57.1%)	3 (42.9%)
INC280 10 mg/kg/d (n=7)	0 (0%)	7 (100%)	0 (0%)	7 (100%)

Orthotopes Panc02-Modell²

	LK-Metastasen		Aszites	
	positiv	negativ	positiv	negativ
Kontrolle (n=9)	6 (66.7%)	3 (33.3%)	3 (33.3%)	6 (66.7%)
INC280 (n=7)	1 (14.3 %)	6 (85.7%)	1 (14.3 %)	6 (85.7%)
Gemcitabin (n=8)	2 (25%)	6 (75%)	2 (25%)	6 (75%)
INC280+Gemcitabin (n=8)	1 (12.5%)	7 (87.5%)*	0 (0%)	8 (100%)

¹ unserer Erfahrung nach keine Aszitesbildung

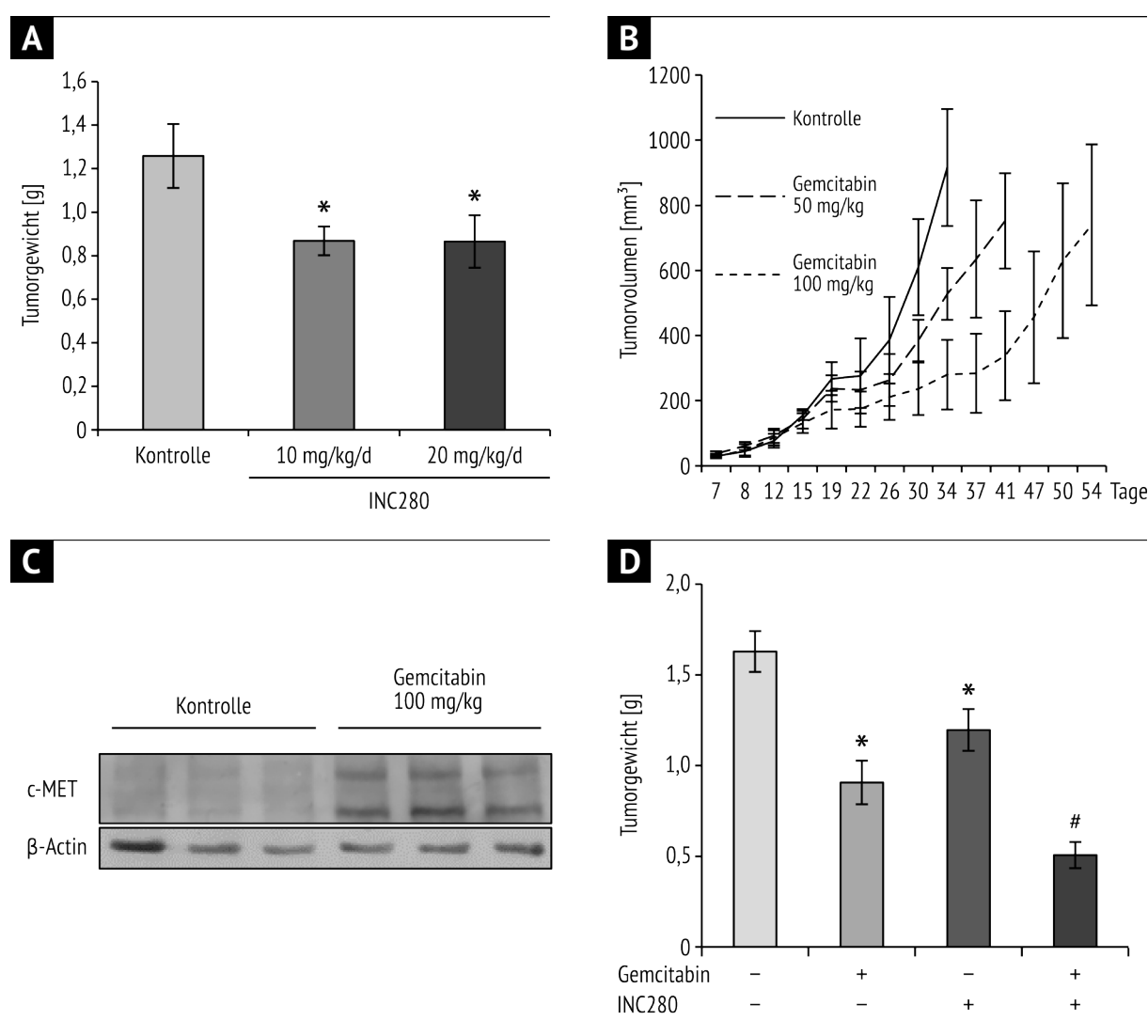
² unserer Erfahrung nach keine Lebermetastasenbildung

* $p < 0.05$ vs. Kontrolle

Tabelle 1 Metastasenbildung in orthotopen xenogenen und syngenem Pankreaskarzinommodellen

Anschließend immunhistochemische Aufarbeitungen zeigten eine signifikante Inhibition der Tumorzellproliferation (Ki-67-Färbung) in allen Behandlungsgruppen (Abb. 3E). Die Kombinationstherapie war auch hier den Monotherapien signifikant überlegen. Hinsichtlich der Vaskularisierung (CD31-Färbung) wiesen alle Behandlungsgruppen eine signifikante Reduktion gegenüber der Kontrollgruppe auf, zwischen den jeweiligen Behandlungsgruppen ließ sich jedoch kein Unterschied nachweisen (Abb. 3F). Die mittels TUNEL-Färbung ermittelte Apoptose blieb von der Therapie unbeeinflusst.

Diese Ergebnisse zeigen deutlich den potentiellen therapeutischen Nutzen für eine Kombinationsbehandlung aus Gemcitabin und c-MET-Inhibition.



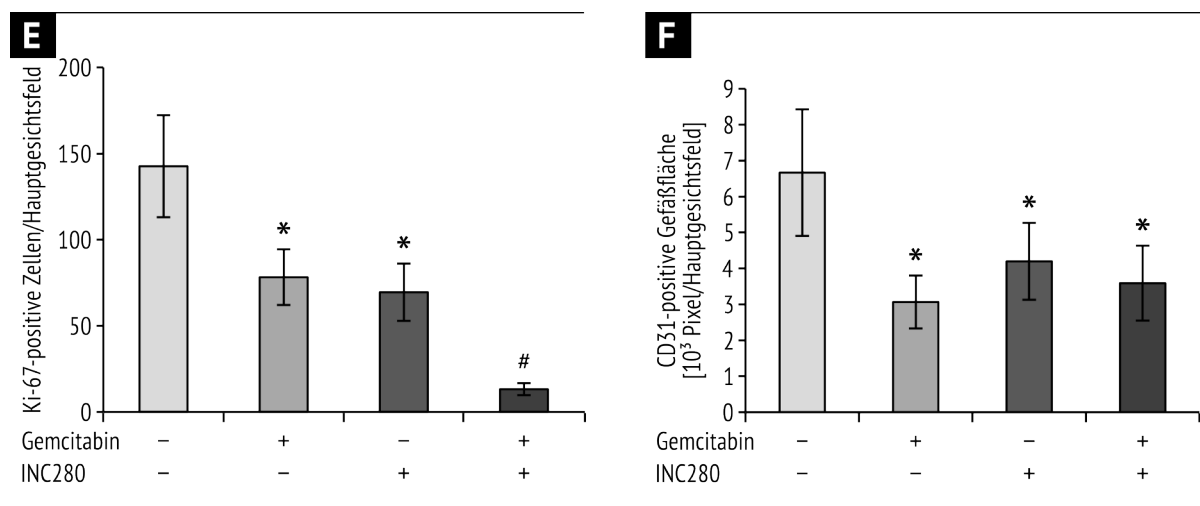


Abb. 3 Exemplarischer Auszug einiger *in vivo*-Daten **A)** Orthotopes, syngenes Tumormodell (L3.6pl); signifikante Reduktion des finalen Tumorgewichts durch Behandlung mit INC280 (* $p < 0.05$) **B)** Syngenes, subkutanes Modell (Panc02); initiale Wachstumsinhibition unter Gemcitabin-Therapie, im Verlauf wieder exponentielle Wachstumsphase **C)** Western Blot Tumorgewebe; gesteigerte c-MET-Expression durch Gemcitabin-Behandlung **D)** Syngenes, orthotopes Modell (Panc02); signifikante Reduktion des finalen Tumorgewichts durch Behandlung mit Gemcitabin und INC280 (* $p < 0.05$) mit deutlicher Überlegenheit der Kombinationstherapie (# $p < 0.05$). **E)** Immunhisto Ki-67-Färbung; Signifikante Reduktion der Tumorphilierung unter Therapie mit Gemcitabin und INC280 (* $p < 0.05$ vs. Kontrolle, # $p < 0.05$ vs. Gemcitabin- und INC280-Monotherapie). **F)** Immunhisto CD31-Färbung; Signifikante Reduktion der Angiogenese unter Therapie mit Gemcitabin und INC280 (* $p < 0.05$) ohne zusätzlichen Vorteil der

4.7 Überlebensvorteil durch c-MET-Inhibition in Kombination mit Gemcitabin

Der klinische Alltag zeigt, dass sich über 80% der Patienten bei Diagnosestellung in einem fortgeschrittenen Tumorstadium befinden und eine systemische Chemotherapie erhalten [3]. Um dieser Situation gerecht zu werden, führten wir fürs Erste ein subkutanes, syngenes Tumormodell mit verzögertem Behandlungsbeginn durch (Panc02). Ab einer Tumorgroße von 100 mm³ wurde die Behandlung mit Gemcitabin (100 mg/kg zweimal pro Woche) begonnen. Aus den Ergebnissen unseres initialen, subkutanen Gemcitabin-Tumormodells schlussfolgerten wir, dass diese Dosierung anfänglich bis zu einer Tumorgroße von 300 mm³ zu einer Verzögerung des Tumorwachstums führt und der Tumor anschließend wieder in ein exponentielles Wachstum übergeht. Somit definierten wir Tumore > 300 mm³ als klinisch progredient und fügten INC280 als „Zweitlinientherapie“ hinzu. Nach Erreichen einer Tumorgroße von 800 mm³ wurden entsprechende Mäuse getötet. In diesem Modell konnten wir nachweisen, dass die initiale Behandlung mit Gemcitabin

wie erwartet zu einer Verzögerung des Tumorwachstums führt. Eine zeitlich verzögerte, alleinige Behandlung mit INC280 (Tumore $> 300 \text{ mm}^3$) hingegen ergab keinen Behandlungsvorteil. Als effektivste Therapie erwies sich die Kombination aus Gemcitabin und INC280 mit deutlich reduzierter Progression des Tumorwachstums auch gegenüber der Gemcitabin-Monotherapie (Abb. 4A). Da das Mikromilieu einen bekannten Einfluss auf Tumorwachstum und Resistenzentwicklung gegenüber Zytostatika hat [41], übertrugen wir den Versuch anschließend auf ein orthotopes, syngenes Tumormodell (Panc02). Die Behandlung mit Gemcitabin (100 mg/kg zweimal pro Woche) wurde an Tag 10 initiiert, an Tag 20 fügten wir INC280 (10 mg/kg/d) hinzu. In Einklang mit dem subkutanen Vorversuch bestätigte sich in diesem orthotopen Modell, dass eine alleinige Behandlung mit INC280 keinen Einfluss auf bereits fortgeschrittene Tumore hat und die Behandlung mit Gemcitabin zu einer signifikanten Verbesserung des Überlebens führt. Wie im subkutanen Modell erwies sich aber auch hier die verzögerte INC280-Behandlung bei den mit Gemcitabin vorthapierten Tumoren als signifikant überlegene Therapieoption gegenüber den Monotherapiegruppen (Abb. 4B). Daraus lässt sich ableiten, dass eine Erweiterung der systemischen Gemcitabin-Therapie um einen c-MET-Inhibitor auch in fortgeschrittenen Stadien des Pankreaskarzinoms sinnvoll ist.

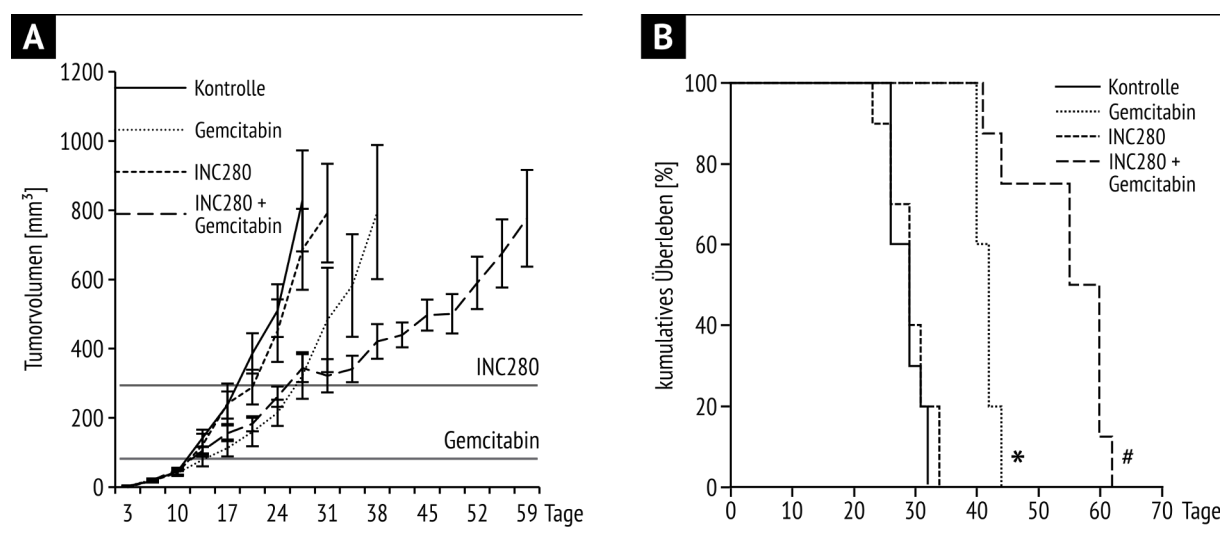


Abb. 4 Kombinationstherapie Gemcitabin + INC280 **A)** Syngenes, subkutanes Modell (Panc02); Therapie mit Gemcitabin ab $> 80 \text{ mm}^3$ führt zu einer Wachstumsverzögerung, Kombination aus Gemcitabin und INC280 bei Tumorprogress ($> 300 \text{ mm}^3$) zu einer signifikant verbesserten Wachstumsinhibition. **B)** Syngenes, orthotopes Überlebensmodell (Panc02); signifikante Überlebensverlängerung unter Gemcitabin-Monotherapie (* $p < 0.05$ vs. Kontrolle und INC280) sowie unter Kombinationstherapie (* $p < 0.01$ vs. Kontrolle, $p < 0.05$ vs. Gemcitabin). A) Fehlerbalken: Standardfehler des Mittelwerts.

5 Diskussion

Das Pankreaskarzinom gehört weiterhin zu den Tumorentitäten mit der schlechtesten Prognose gemessen am 5-Jahresüberleben. Die einzige kurative Therapieoption besteht in der chirurgischen Intervention [1, 2]. Die Mehrheit der Patienten stellt sich jedoch in Stadien vor, in denen eine vollständige chirurgische Resektion nicht mehr durchgeführt werden kann [3]. Vor diesem Hintergrund werden dringend neue systemische, zielgerichtete Therapeutika benötigt, um die Prognose der Patienten zu verbessern. In dieser Arbeit untersuchten wir einen neuen, oral verfügbaren ATP-kompetitiven Inhibitor der Rezeptortyrosinkinase c-MET und die Auswirkungen einer solchen Blockade auf Pankreaskarzinomzellen *in vitro* und *in vivo*. Es ist uns gelungen, sowohl in humanen als auch in murinen Pankreaskarzinommodellen mittels c-MET-Hemmung eine HGF-induzierte Aktivierung onkogener Signaltransduktionswege effektiv aufzuheben. Darüber hinaus führte eine Behandlung mit dem c-MET-Inhibitor INC280 zu einer Reduktion des Tumorwachstums *in vivo* und erzielte in Kombination mit Gemcitabin eine effektive Überlebensverlängerung im Mausmodell. Insgesamt deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass durch eine Blockade der Zielstruktur c-MET der Therapieerfolg bei Patienten mit Pankreaskarzinom gesteigert werden kann.

Im exokrinen Pankreas herrscht physiologischerweise ein niedriges Expressionsniveau für c-MET und HGF. Bei Progress zur intraepithelialen Neoplasie (PanIN) oder dem dukalen Adenokarzinom zeigen sich jedoch deutlich erhöhte Expressionsniveaus für c-MET und HGF [28, 42, 43]. Mehrere Studien haben einen Zusammenhang zwischen der Aktivierung des c-MET-Signalwegs und der Phosphorylierung intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden wie PI3K/Akt, MAP/ERK oder FAK in Pankreaskarzinommodellen hergestellt. Die Phosphorylierung dieser Signalwege führt u.a. zu einer gesteigerten Tumorzellinvasivität und -motilität und generiert eine Resistenz gegenüber Gemcitabin [29, 44-46]. Mit unserer Studie bestätigen wir, dass eine Behandlung der pankreatischen Tumorzelllinien mit dem c-MET-Inhibitor INC280 das Tumorwachstum und die Tumormotilität signifikant hemmen kann. Dafür verantwortlich ist zumindest partiell eine Inhibition der Akt-, ERK- und FAK-Phosphorylierung. Dieser Effekt war lediglich nach vorheriger Stimulation mit HGF nachweisbar; unter konstitutiven Bedingungen zeigte sich

interessanterweise keine Beeinflussung von Wachstum, Motilität und der Aktivierung von Signalmolekülen. Das ist von besonderer Bedeutung, da das Stroma als ein Ursprung von HGF bekannt ist. Außerdem wiesen Ide *et al.* in einer Studie nach, dass eine stromale HGF-Expression in Pankreaskarzinomen mit einer schlechten Prognose assoziiert ist [47]. Hierfür könnte die Phosphorylierung onkogener Signalkaskaden durch parakrine Aktivierung des c-MET-Rezeptors verantwortlich sein und zu einer gesteigerten Tumoraggressivität führen. Anhand unserer Erkenntnisse wird deutlich, dass eine c-MET-Blockade durch INC280 diese Prozesse aufheben und damit einen positiven Einfluss auf die Prognose von Pankreaskarzinompatienten haben könnte.

Die Resistenz gegenüber fast jeder systemischen Therapie stellt eine große Herausforderung in der Behandlung des Pankreaskarzinoms dar. Gemcitabin, welches über viele Jahre als Standardtherapie des Pankreaskarzinoms galt, hat lediglich Ansprechraten zwischen 5,6% und 13,3% [48]. Neuere Therapieregime wie FOLFIRINOX erreichen indes Ansprechraten von 30%, gehen aber bei mehr als 50% der Patienten mit massiven Nebenwirkungen einher [7]. Vorangegangene Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen der Resistenz von Pankreaskarzinomzellen und der Behandlung mit Gemcitabin, welche u.a. durch eine gesteigerte epithelial-mesenchymale Transition (EMT) vermittelt wird. Zu den Genen, die bei dieser Phänotyptransition eine Rolle spielen, zählt auch c-MET [46]. Darüber hinaus definierten Li *et al.* c-MET als Marker für Pankreaskarzinomstammzellen mit hohem Selbsterneuerungspotenzial [26]. Hage *et al.* kamen in ihren Untersuchungen zu dem Ergebnis, dass eine Behandlung mit dem dualen Inhibitor Cabozantinib (c-MET und VEGFR-2) die Effektivität von Gemcitabin steigert, selbst wenn die Tumorzellen eine Resistenz gegenüber diesem Chemotherapeutikum aufweisen [29]. Ähnliche Schlüsse können wir auch aus unseren Versuchen ziehen: MiaPaCa2-Tumorzellen wiesen ebenfalls ein erhöhtes c-MET-Expressionsniveau auf, sobald sie resistent gegen Gemcitabin waren (MiaPaCa2(G250)). Zudem scheint der c-MET-Rezeptor in diesen Zellen funktionell aktiv zu sein, da durch Inkubation mit HGF Wachstum, Motilität und die Phosphorylierung intrazellulärer Signalkaskaden induziert werden konnte. Interessanterweise konnten wir in unseren Experimenten eine Expression von *MDR1*-mRNA in Gemcitabin-resistenten MiaPaCa2(G250)-Zellen nachweisen. Im Gegensatz dazu war in nativen MiaPaCa2(par) *MDR1*-mRNA

nicht exprimiert. Dies ist von besonderer Bedeutung, da die Expression von *MDR1* und seinem kodierenden Protein P-gp („permeability glycoprotein“) mit einer reduzierten Medikamentenaufnahme in Zusammenhang gebracht wird und somit möglicherweise für die Resistenz gegenüber der Chemotherapie mitverantwortlich ist [36, 37, 49]. Die Regulation von *MDR1* ist mit der Aktivierung und Stabilisierung von HIF-1 α assoziiert. Somit ist erklärlich, dass auch in unseren Versuchen die *MDR1*-mRNA-Expression nach Stimulation mit DFX, d.h. nach Schaffung hypoxischer Bedingungen, hochreguliert war. Publierte Studien weisen darauf hin, dass durch c-MET-Blockade HIF-1 α in Tumorzellen gehemmt werden kann [50-54]. So konnten auch wir eine Reduktion dieses Transkriptionsfaktors durch c-MET-Inhibition in MiaPaCa2(G250)-Zellen nachweisen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Behandlung mit dem c-MET-Inhibitor INC280 sowohl die Hypoxie-induzierte *MDR1*-Expression hemmt als auch HGF-vermittelte Effekte auf Wachstum, Motilität und Signalmediatoren in Gemcitabin-resistenten Tumorzellen *in vitro* aufhebt. Hieraus ließe sich schlussfolgern, dass die Behandlung mit Gemcitabin zur Selektion einer Tumorzellpopulation mit hoher c-MET-Expression führt (potentielle Tumorstammzellen) und dies eine Rationale für den Einsatz von c-MET-Inhibitoren beim Pankreaskarzinom zumindest dann darstellt, wenn die Karzinome Gemcitabin-resistent werden.

Um unsere Erkenntnisse weiter *in vivo* zu bestätigen, untersuchten wir syngene, orthotope Pankreaskarzinommodelle. Besonders vorteilhaft an diesen Modellen ist die Existenz eines intakten Immunsystems im Wirt und das vorhandene, den Tumor umgebende Mikromilieu [55]. Wie aufgrund unserer *in vitro*-Daten bereits zu erwarten, zeigte sich auch in den orthotopen *in vivo*-Modellen die Kombinationstherapie aus Gemcitabin und dem c-MET-Inhibitor INC280 hinsichtlich der Tumordinhibition den Monotherapien deutlich überlegen. Interessanterweise korrelierte dieser Effekt mit der Hemmung der Tumorzellproliferation ohne nachweislichen Unterschied in der Tumorzellapoptose; diese Ergebnisse sind kongruent mit denen von Li *et al.*, die eine antiproliferative Wirkung durch die Kombinationsbehandlung aus Gemcitabin und c-MET-Inhibitor nachwiesen [26]. Im Gegensatz zu unserem Modell verwendeten Li *et al.* jedoch immunkompromittierte NOD/SCID-Mäuse mit primären humanen Pankreaskarzinomzellen. Hage *et al.* erzielten *in vitro* durch Kombination des c-MET-Inhibitors Cabozantinib mit

Gemcitabin eine deutlich gesteigerte Apoptoserate in Karzinomzellen [29]. Diese Ergebnisse wurden jedoch nicht durch weitere *in vivo*-Experimente reproduziert. Zusammengefasst bestätigen wir mit unserer Untersuchung die Argumentation für den Einsatz einer Kombinationstherapie aus c-MET-Inhibitoren mit Gemcitabin bei Patienten mit Pankreaskarzinom.

Der klinische Alltag zeigt, dass sich die Mehrzahl der Patienten in fortgeschrittenen Tumorstadien präsentiert, in denen der Einsatz solcher zielgerichteter und somit effektiverer Substanzen höchst notwendig ist. Bezüglich der c-MET-Inhibitoren waren wir ausgesprochen optimistisch, da vorherige Studien gezeigt hatten, dass mit Gemcitabin vorbehandelte Mäuse eine deutliche Hochregulierung des c-MET-Rezeptors aufweisen und sich dieser dadurch ideal als Zielstruktur eignet. Um der klinischen Situation gerecht zu werden, setzten wir INC280 in unserem syngenem, orthotopen Überlebensmodell erst in fortgeschrittenen Tumorstadien ein. Die Zugabe des c-MET-Inhibitors INC280 zur regulären Gemcitabin-Therapie bei deutlichem Tumorprogress führte zu einer signifikanten Lebensverlängerung der Mäuse. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit einer publizierten Arbeit von Avan *et al.* Durch Kombination von Gemcitabin mit dem ATP-kompetitiven c-MET-Inhibitor Crizotinib konnte ein deutlicher Überlebensvorteil bei Mäusen mit duktalem Adenokarzinom nachgewiesen werden [45]. Im Gegensatz zu Avan *et al.*, welche eine simultane Behandlung mit Gemcitabin und Crizotinib 5 Tage nach Tumorzellimplantation initiierten, begannen wir die Gemcitabin-Therapie erst an Tag 10 und wählten einen späteren Zeitpunkt für den Behandlungsbeginn mit INC280 (20 Tage nach Tumorzellinjektion). Da Gemcitabin nach wie vor die Erstlinientherapie darstellt und der Einsatz anderer Therapeutika oft erst nach Therapieversagen evaluiert wird, sind wir der Meinung, dass mit unserem experimentellen Modell die klinische Situation besser widerspiegelt wird.

Zweifellos hat unsere Studie gewisse Limitationen. Sowohl für unsere *in vitro*- als auch für die *in vivo*-Versuche verwendeten wir lediglich Tumorzelllinien, welche meist einer deutlich höheren Proliferationsrate unterliegen als direkt aus humanem oder tierischem Gewebe gewonnene primäre Tumorzellen. Durch wiederholte Passageschritte kommt es zum Auftreten multipler neuer genetischer Aberrationen. Diese entsprechen jedoch nicht denen eines Primärtumors und repräsentieren bei weitem nicht dessen epigenetische und genetische Komplexität. Somit lässt sich

anhand unserer Ergebnisse nur eingeschränkt beurteilen, inwieweit Pankreaskarzinomzellen durch Inhibition der Zielstruktur c-MET hinsichtlich Proliferation, Migration und Angiogenese beeinflusst werden. *In vivo* kommt erschwerend hinzu, dass wir für die humanen Tumorzelllinien Nacktmäuse mit supprimiertem Immunsystem verwendeten. In den syngen, orthotopen Modellen wiederum lässt sich das Wachstumsverhalten muriner Tumore nicht vollständig auf den Menschen übertragen. Dafür wies der Wirt ein intaktes Immunsystem und das den Tumor umgebende, für ihn so essentielle Mikromilieu auf. Eine sinnvolle Ergänzung wäre der Einsatz genetisch modifizierter Mäuse („genetically engineered mouse model“, GEMM), welche nach Einführen entsprechender DNA spontan Tumore entwickeln. Aufgrund der spontanen Karzinogenese und deren Wechselwirkung mit dem sich parallel entwickelnden Mikromilieu repräsentiert dieses Modell sehr gut die klinische Situation, spiegelt jedoch durch seine Uniformität auch nicht die genetische Variabilität der humanen Pankreaskarzinome wider. Zudem ist die Verwendung solcher Modelle sehr aufwendig und teuer, da zur Aufzucht eines transgenen Stammes ein Vielfaches an Muttertieren und ein enges Monitoring notwendig sind. Nicht zu vernachlässigen ist, dass es auch bei zielgerichteten Therapeutika („targeted therapies“) zu erheblichen Nebenwirkungen kommen kann, die unter Umständen sogar zu einem Abbruch der Therapie führen. Bei dem Einsatz von INC280 im Rahmen verschiedener Phase-I-Studien bei Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren wies die Mehrzahl der Patienten jedoch lediglich Grad-I/II-Nebenwirkungen auf. Nur in seltenen Fällen musste bei Auftreten von Grad-III/IV-Nebenwirkungen die Therapie abgebrochen werden.

In der Summe konnten wir mit unserer Arbeit nachweisen, dass durch eine Blockade der Zielstruktur c-MET eine wirksame Inhibition des Tumorwachstums auch in fortgeschrittenen Tumorstadien erreicht werden kann. Gerade in diesen Stadien spielt die erworbene Gemcitabinresistenz eine entscheidende Rolle, kann jedoch durch den Einsatz von c-MET-Inhibitoren aufgehoben werden. Hierdurch lassen sich aktuelle antineoplastische Therapiestrategien zur Behandlung von Pankreaskarzinompatienten möglicherweise deutlich verbessern.

6 Zusammenfassung der Arbeit

Einleitung und Zielsetzung

Das Pankreaskarzinom stellt aufgrund seines aggressiven Wachstumsverhaltens bis zum heutigen Tag die vierthäufigste malignombedingte Todesursache dar. Gemcitabin gilt weiterhin als systemischer Therapiestandard bei fortgeschrittenen Tumoren, dies jedoch mit sehr limitierter Prognose (medianes Überleben 5,6 Monate), sodass ein hoher Bedarf an neuen, tumorbiologisch wirksameren Substanzen zur Therapieoptimierung besteht. Ziel unserer Arbeit war es, die Auswirkungen einer zielgerichteten medikamentösen c-MET-Blockade auf Pankreaskarzinomzellen *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen.

Methoden

Für unsere Experimente verwendeten wir die humanen Pankreaskarzinomzelllinien BxPC-3, MiaPaCa2, HPAF-II, L3.6pl und die murine Zelllinie Panc02, humane Endothelzellen und glatte Gefäßmuskelzellen. Zudem setzten wir die Tumorzelllinie MiaPaCa2(G250) mit erworbener Gemcitabinresistenz ein. *In vitro* untersuchten wir die Auswirkungen einer c-MET-Blockade durch den Inhibitor INC280 mittels MTT, Migrationsanalysen, Western Blot und ELISA. *In vivo* führten wir xenogene und syngene subkutane sowie orthotope Modelle durch um den Einfluss der c-MET-Inhibition allein und in Kombination mit Gemcitabin auf Pankreaskarzinomzellen zu evaluieren.

Ergebnisse

In vitro führte eine Blockade des c-MET-Rezeptors zu einer signifikanten Inhibition von Tumorzellwachstum und -motilität sowie zu einer wirksamen Hemmung der onkogenen Signalübertragung in Tumorzellen nach Stimulation mit HGF. Diese Ergebnisse waren in Endothelzellen reproduzierbar. Auf VSMCs hingegen hatte INC280 nur einen vernachlässigbaren Effekt. MiaPaCa2(G250) wiesen interessanterweise eine gesteigerte c-MET-Expression gegenüber MiaPaCa2 auf. Durch c-MET-Inhibition konnten sowohl HGF-induzierte Effekte als auch die DFX-getriggerte Expression von HIF-1 α und *MDR1* in diesen Zellen wirksam aufgehoben werden. *In vivo* ließ sich durch Inhibition der RTK c-MET mittels INC280 eine signifikante Reduktion des Tumorgewichts und ein Trend zu reduzierter

Metastasenbildung nachweisen. Ähnlich wie *in vitro* war die c-MET-Expression auch *in vivo* unter Therapie mit Gemcitabin hochreguliert. Durch eine Kombinationsbehandlung aus INC280 und Gemcitabin konnte die antineoplastische Wirksamkeit der Monotherapien signifikant gesteigert werden. Der Überlebensvorteil dieser Kombinationstherapie war selbst bei verzögertem Behandlungsbeginn mit INC280 nachweisbar. In der immunhistochemischen Aufarbeitung bestätigten sich unsere Ergebnisse. Mittels Ki-67- und CD31-Färbung konnten wir in allen Behandlungsgruppen eine signifikante Reduktion der Tumorzellproliferation und Vaskularisierung gegenüber der Kontrollgruppe nachweisen. Hinsichtlich der Tumorzellproliferation erwies sich die Kombinationstherapie erneut als signifikant überlegen gegenüber den Monotherapien. Lediglich die via TUNEL-Färbung ermittelte Apoptose blieb von der Therapie unbeeinflusst.

Schlussfolgerung

Durch eine Blockade der Zielstruktur c-MET kann eine wirksame Inhibition des Tumorwachstums erreicht und die in fortgeschrittenen Tumorstadien auftretende, erworbene Gemcitabinresistenz überwunden werden. Hierdurch ließen sich aktuelle antineoplastische Therapiestrategien möglicherweise deutlich verbessern.

7 Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluorouracil
ANOVA	Analysis of variance
cDNA	complementary DNA
CSC	cancer stem cell
DFX	Deferoxamin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC	endothelial cell
EGFR	epidermal growth factor receptor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
FCS	fetal calf serum
FOLFIRINOX	5-Fluorouracil, Leucovorin, Irinotecan, Oxaliplatin
HGF	hepatocyte growth factor
HIF-1 α	hypoxia-inducible factor 1-alpha
i.p.	intraperitoneal
KG	Körpergewicht
LAPC	locally advanced pancreatic cancer
LK	Lymphknoten
MDR1	Multi Drug Resistance Protein 1
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
nab-Paclitaxel	nanoparticle albumin bound paclitaxel
PanIN	pancreatic intraepithelial neoplasia
PBS	phosphate buffered saline

PDGF-B	platelet derived growth factor subunit B
P-gp	permeability glycoprotein
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
RTK	Rezeptortyrosinkinase
RT-PCR	real time polymerase chain reaction
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
TBS	tris-buffered saline
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling
VEGF-A	vascular endothelial growth factor A
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor
VSMC	vascular smooth muscle cell

8 Literaturverzeichnis

1. **Malvezzi M, Bertuccio P, Levi F, La Vecchia C, Negri E.** European cancer mortality predictions for the year 2013. *Ann Oncol.* 2013, 24: 792-800.
2. **Siegel R, Naishadha D, Jemal A.** Cancer statistics, 2013. *CA Canc J Clin.* 2013, 63: 11-30.
3. **Stathis A, Moore MJ.** Advanced pancreatic carcinoma: current treatment and future challenges. *Nat Rev Clin Oncol.* 2010, 7: 163-72.
4. **Di Marco M, Di Cicilia R, Macchini M, Nobili E, Vecchiarelli S, Brandi G, et al.** Metastatic pancreatic cancer: Is gemcitabine still the best standard treatment? *Oncol Rep.* 2010, 23: 1183-92.
5. **Burris HA III, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, et al.** Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol.* 1997, 15(6): 2403-13.
6. **Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, Chiorean G, Infante J, Moore M, et al.** Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *N Engl J Med.* 2013, 369(18): 1691-703.
7. **Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouche O, Giumbaud R, Becouarn Y, et al.** Folfirinox versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med.* 2011, 364: 1817-25.
8. **Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Davidson NE, et al.** Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 2005, 353: 1673-84.
9. **Stewart BW, Wild CP.** World cancer report 2014. *International Agency for Research on Cancer, WHO.* 2014.
10. **Grillo F, Fassan M, Sarocchi F, Fiocca R, Mastracci L.** HER2 heterogeneity in gastric/gastroesophageal cancers: from benchside to practice. *World J Gastroenterol.* 2016, 22(26): 5879-87.
11. **Villanueva A, Llovet JM.** Targeted therapies for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2011, 140: 1410-26.
12. **Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S, et al.** Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the national cancer institute of canada clinical trials group. *J Clin Oncol.* 2007, 25: 1960-6.
13. **Chmielewicz J, Borowiak M, Morkel M, Stradal T, Munz B, Werner S, et al.** c-Met is essential for wound healing in the skin. *J Cell Biol.* 2007, 177(1): 151-62.
14. **Huh CG, Factor VM, Sanchez A, Uchida K, Conner EA, Thorgerirsson SS, et al.** Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004, 101: 4477-82.
15. **Rabkin R, Fervenza F, Tsao T, Sibley R, Friedlaender M, Hsu F, et al.** Hepatocyte growth factor receptor in acute tubular necrosis. *J Am Soc Nephrol.* 2001, 12: 531-40.
16. **Trusolino L, Bertotti A, Comoglio PM.** MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Biol.* 2010, 11: 834-48.
17. **Christensen JG, Burrows J, Salgia R.** c-met as a target for human cancer and characterization of inhibitors for therapeutic intervention. *Cancer Lett.* 2005, 225: 1-26.
18. **Okuda K, Sasaki H, Yukiue H, Yano M, Fujii Y.** Met gene copy number predicts the prognosis for completely resected non-small cell lung cancer. *Cancer Sci.* 2008, 99(11): 2280-5.

19. **Toiyama Y, Miki C, Inoue Y, Okugawa Y, Tanaka K, Kusunoki M, et al.** Serum hepatocyte growth factor as a prognostic marker for stage II or III colorectal cancer patients. *Int J Canc.* 2009, 125: 1657-62.
20. **Gupta A, Karakiewicz PI, Roehrborn CG, Lotan Y, Zlotta AR, Shariat SF, et al.** Predictive value of plasma hepatocyte growth factor/scatter factor levels in patients with clinically localized prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2008, 12(22): 7385-90.
21. **Cappuzzo F, Marchetti A, Skokan M, Rossi E, Gajapathy S, Felicioni L, et al.** Increased MET gene copy number negatively affects survival of surgically resected non-small cell lung cancer patients. *J Clin Oncol.* 2009, 27: 1667-74.
22. **Kammula US, Kuntz EJ, Francone TD, Zeng Z, Shia J, Landmann RG, et al.** Molecular co-expression of the c-met oncogene and hepatocyte growth factor in primary colon cancer predicts tumor stage and clinical outcome. *Cancer Lett.* 2007, 248: 219-28.
23. **Jo M, Stolz DB, Esplen JE, Dorko K, Michalopoulos, Strom SC.** Cross-talk between epidermal growth factor receptor and c-met signal pathways in transformed cells. *J Biol Chem.* 2000, 275(12): 8806-11.
24. **Guo A, Villén J, Kornhauser J, Lee KA, Stokes MP, Rikova K, et al.** Signaling networks assembled by oncogenic EGFR and c-met. *Proc Natl Acad Sci.* 2008, 105(2): 692-7.
25. **Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF.** Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Biol.* 2003, 4: 915-25.
26. **Li C, Wu JJ, Hynes M, Dosch J, Sarkar B, Welling TH, et al.** c-met is a marker of pancreatic cancer stem cells and therapeutic target. *Gastroenterology.* 2011, 141: 2218-27.
27. **Zhu GH, Huang C, Qui ZJ, Liu J, Zhang ZH, Zhao N, et al.** Expression and prognostic significance of CD151, c-met, and integrin alpha3/alpha6 in pancreatic ductal adenocarcinoma. 2011, 56: 1090-8.
28. **Park JK, Kim MA, Ryu JK, Yoon YB, Kim SW, Han HS, et al.** Postoperative prognostic predictors of pancreatic ductal adenocarcinoma: clinical analysis and immunoprofile on tissue microarrays. *Ann Surg Oncol.* 2012, 19: 2664-72.
29. **Hage C, Rausch V, Giese N, Giese T, Schönsiegel F, Labsch S, et al.** The novel c-met inhibitor cabozantinib overcomes gemcitabine resistance and stem cell signaling in pancreatic cancer. *Cell Death Dis.* 2013, 4: e627. doi: 10.1038/cddis.2013.158.
30. **Jung KA, Choi BH, Kwak MK.** The c-met/PI3K signaling is associated with cancer resistance to doxorubicin and photodynamic therapy by elevating BCRP/ABCG2 expression. *Mol Pharmacology.* 2015, 87: 465-76.
31. **Ozasa H, Oguri T, Maeno K, Takakuwa O, Kunii E, Yagi Y, et al.** Significance of c-met overexpression in cytotoxic anticancer drug-resistant small-cell lung cancer cells. *Cancer Sci.* 2014, 105: 1032-9.
32. **Yashiro M, Nishii T, Hasegawa T, Matsuzaki T, Morisaki T, Fukuoka T, et al.** A c-met inhibitor increases the chemosensitivity of cancer stem cells to the irinotecan in gastric carcinoma. *B J Cancer.* 2013, 109: 2619-28.
33. **Liu X, Wang Q, Yang G, Marando C, Koblisch HK, Hall LM, et al.** A novel kinase inhibitor, INCB28060, blocks c-met-dependent signaling, neoplastic activities, and cross-talk with EGFR and HER-3. *Clin Cancer Res.* 2011, 17(22): 7127-38.
34. **Moran-Jones K, Brown LM, Samimi G.** INC280, an orally available small molecule inhibitor of c-met, reduces migration and adhesion in ovarian cancer cell models. *Sci Rep.* 2015, 5: 11749. doi:10.1038/srep11749.
35. **clinicaltrials.gov [Internet].** Bethesda, MD: National Library of Medicine (US). 2010 Feb 18- . Identifier NCT01072266, A phase I, open-label, dose-escalation study to determine the safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of INCB28060 in subjects with advanced malignancies. 2016 Feb 20. Available from: . <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01072266>

-
36. **Gottesman MM, Fojo T, Bates SE.** Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer.* 2002, 2: 48-58.
 37. **Goldstein LJ, Galski H, Willingham M, Lai SH, Gazdar A, Pirker R.** Expression of multidrug resistance gene in human cancers. *J Natl Cancer Inst.* 1989, 81: 116-24.
 38. **Neesse A, Michl P, Frese KK, Feig C, Cook N, Jacobetz MA, et al.** Stromal biology and therapy in pancreatic cancer. *Gut.* 2011, 60: 861-8.
 39. **Geer RJ, Brennan MF.** Prognostic indicators for survival after resection of pancreatic adenocarcinoma. *Am J Surg.* 1993, 165: 68-72.
 40. **Yachida S, Jones S, Bozic I, Antal T, Leary R, Fu B, et al.** Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature.* 2010, 467(7319): 1114-7.
 41. **Borovski T, de Sousa e Melo F, Vermeulen L, Medema JP.** Cancer stem cell niche: the place to be. *Cancer Res.* 2011, 71: 634-9.
 42. **Di Renzo MF, Poulson R, Olivero M, Comoglio PM, Lemoine NR.** Expression of the Met/hepatocyte growth factor receptor in human pancreatic cancer. *Cancer Res.* 1995, 55: 1129-38.
 43. **Ebert M, Yokoyama M, Friess H, Büchler MW, Korc M.** Coexpression of the c-met proto-oncogene and hepatocyte growth factor in human pancreatic cancer. *Cancer Res.* 1994, 54: 5575-8.
 44. **Jin H, Yang R, Zheng Z, Romero M, Ross J, Bou-Reslan H, et al.** MetMab, the one-armed 5D5 anti-c-met antibody, inhibits orthotopic pancreatic tumor growth and improves survival. *Cancer Res.* 2008, 11: 4360-8.
 45. **Avan A, Caretti V, Funel N, Galvani E, Maftouh M, Honeywell RK, et al.** Crizotinib inhibits metabolic inactivation of gemcitabine in c-met-driven pancreatic carcinoma. *Cancer Res.* 2013, 73: 6745-56.
 46. **Shah AN, Summy JM, Zhang J, Park SI, Parikh NU, Gallick GE.** Development and characterization of gemcitabine-resistant pancreatic tumor cells. *Ann Surg Oncol.* 2007, 14: 3629-37.
 47. **Ide T, Kitajima Y, Miyoshi A, Ohtsuka T, Mitsuno M, Ohtaka K, et al.** The hypoxic environment in tumor-stromal cells accelerates pancreatic cancer progression via the activation of paracrine hepatocyte growth factor/c-met signaling. *Ann Surg Oncol.* 2007, 14: 2600-7.
 48. **Ying JE, Zhu LM, Liu BX.** Developments in metastatic pancreat cancer: is gemcitabine still the standard? *World J Gastroenterol.* 2012, 18: 736-45.
 49. **Zhang W, Chen H, Liu DL, Li H, Luo J, Zhang JH, et al.** Emodin sensitizes the gemcitabine-resistant cell line Bxpc-3/Gem to gemcitabine via downregulation of NF- κ B and its regulated targets. *Int J Oncol.* 2013, 42: 1189-96.
 50. **Comerford KM, Wallace TJ, Karhausen J, Louis NA, Montalto MC, Colgan SP.** Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene. *Cancer Res.* 2002, 62: 3387-94.
 51. **Doublier S, Belisario DC, Polimeni M, Annaratone L, Riganti C, Allia E, et al.** HIF-1 activation induces doxorubicin resistance in MCF7 3-D spheroids via P-glycoprotein expression: a potential model of the chemo-resistance of invasive micropapillary carcinoma of the breast. *BMC Cancer.* 2012, 12:4, doi:10.1186/1471-2475-12-4.
 52. **Kitajima Y, Ide T, Ohtsuka T, Miyazaki K.** Induction of hepatocyte growth factor activator gene expression under hypoxia activates the hepatocyte growth factor/c-met system via hypoxia inducible factor-1 in pancreatic cancer. *Cancer Sci.* 2008, 99: 1341-7.
 53. **Vanichapol T, Leelawat K, Hongeng S.** Hypoxia enhances cholangiocarcinoma invasion through activation of hepatocyte growth factor receptor and the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway. *Mol Med Rep.* 2015, 12: 3265-72.
 54. **Matsumara A, Kubota T, Taiyoh H, Fujiwara H, Okamoto K, Ichikawa D, et al.** HGF regulates VEGF expression via the c-met receptor downstream pathways, PI3K/Akt, MAPK and STAT3 in CT26 murine cells. *Int J Oncol.* 2013, 42: 535-42.

-
55. **Ding Y, Cravero JD, Adrian K, Grippo P.** Modeling pancreatic cancer in vivo: from xenograft and carcinogen-induced systems to genetically engineered mice. *Pancreas*. 2010, 39: 283-92.

9 Anhang

9.1 Danksagung

Die Entstehung dieser Arbeit wäre ohne die Unterstützung einer Vielzahl von Personen nicht möglich gewesen. Ich möchte daher die Gelegenheit nutzen und mich bei all denjenigen bedanken, die mir im Laufe dieser Dissertation fachlich und emotional eine große Hilfe waren.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer und Doktorvater Prof. Dr. med. Sven A. Lang. Durch ihn erfuhr ich nicht nur eine kompetente Einführung in die Thematik der molekularen Pankreaskarzinomforschung, welche mein Interesse für die Onkologie bestärkt und mich letztlich in diese abwechslungsreiche internistische Fachrichtung geführt hat. Auch die Betreuung in all den Jahren war großartig.

Herzlich bedanken möchte ich mich außerdem bei Prof. Edward K. Geissler, PhD (Leiter der experimentellen Chirurgie) und Prof. Dr. med. Jürgen Schlitt (Direktor der Klinik und Poliklinik für Chirurgie). Die vertrauensvolle Überlassung von Räumlichkeiten und Labormaterialien machte den experimentellen Teil meiner Arbeit überhaupt erst möglich.

Während der Arbeit im Labor konnte ich mich fortwährend auf die Unterstützung der medizinisch-technischen Assistenten/-tinnen Christine Wagner, Eva Scheiffert, Julia Redekopf und Marvin Anders verlassen. Ohne ihre Hilfe wäre ich bei der Durchführung der Versuche das ein oder andere Mal verzweifelt. Zudem hätte mir die Arbeit ohne das persönliche Miteinander nur halb so viel Freude bereitet.

Von ganzem Herzen danken möchte ich meinen Eltern, die mich bei der Verwirklichung meiner Ziele immer unterstützt haben. Für das geschenkte Vertrauen und den erhaltenen Freiraum bin ich euch sehr dankbar.

9.2 Abdruck der Publikation

Auf den folgenden Seiten ist die dieser Zusammenfassung zugrunde liegende Originalpublikation wiedergegeben.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Targeting cMET with INC280 impairs tumour growth and improves efficacy of gemcitabine in a pancreatic cancer model

Franziska Brandes, Katharina Schmidt, Christine Wagner, Julia Redekopf, Hans Jürgen Schlitt, Edward Kenneth Geissler and Sven Arke Lang*

Abstract

Background: Expression and activation of the cMET receptor have been implicated in tumor progression and resistance to chemotherapy in human pancreatic cancer. In this regard we assessed the effects of targeting cMET in pancreatic cancer models *in vitro* and *in vivo*.

Methods: Human (L3.6pl, BxP3, HPAF-II, MiaPaCa2) and murine (Panc02) pancreatic cancer cell lines, endothelial cells (ECs) and vascular smooth muscle cells (VSMCs) were used for the experiments. Furthermore, the human pancreatic cancer cell line MiaPaCa2 with acquired resistance to gemcitabine was employed (MiaPaCa2(G250)). For targeting the cMET receptor, the oral available, ATP-competitive inhibitor INC280 was used. Effects of cMET inhibition on cancer and stromal cells were determined by growth assays, western blotting, motility assays and ELISA. Moreover, orthotopic xenogeneic and syngeneic mouse (BALB-C nu/nu; C57BL/6) models were used to assess *in vivo* efficacy of targeting cMET alone and in combination with gemcitabine.

Results: Treatment with INC280 impairs activation of signaling intermediates in pancreatic cancer cells and ECs, particularly when cells were stimulated with hepatocyte growth factor (HGF). Moreover, motility of cancer cells and ECs in response to HGF was reduced upon treatment with INC280. Only minor effects on VSMCs were detected. Interestingly, MiaPaCa2(G250) showed an increase in cMET expression and cMET inhibition abrogated HGF-induced effects on growth, motility and signaling as well as DFX-hypoxia HIF-1alpha and MDR-1 expression *in vitro*. *In vivo*, therapy with INC280 alone led to inhibition of orthotopic tumor growth in xenogeneic and syngeneic models. Similar to *in vitro* results, cMET expression was increased upon treatment with gemcitabine, and combination of the cMET inhibitor with gemcitabine improved anti-neoplastic capacity in an orthotopic syngeneic model. Immunohistochemical analysis revealed a significant inhibition of tumor cell proliferation (Ki67) and tumor vascularization (CD31). Finally, combination of gemcitabine with INC280 significantly prolonged survival in the orthotopic syngeneic tumor model even when treatment with the cMET inhibitor was initiated at an advanced stage of disease.

Conclusions: These data provide evidence that targeting cMET in combination with gemcitabine may be effective in human pancreatic cancer and warrants further clinical evaluation.

Keywords: Pancreatic cancer, cMET, Resistance, Survival

* Correspondence: sven.lang@ukr.de

Department of Surgery, University Hospital Regensburg, University of Regensburg, Franz-Josef-Strauss Allee 11, 93053 Regensburg, Germany

Background

Pancreatic cancer is the fourth leading cause for cancer-related death in Europe and the U.S and therefore represents one of the most aggressive malignancies [1,2]. Since pancreatic cancer is often diagnosed in locally advanced or metastatic stages, surgery as the only curative option is possible in only 10–20% of patients [3]. So far, gemcitabine is considered the standard chemotherapy for advanced pancreatic cancer [3]. Although the combination of 5-fluorouracil, leucovorin, irinotecan and oxaliplatin (FOLFIRINOX) recently showed an extension of life by 4 months when compared to gemcitabine, this regime has severe side effects and, therefore, is only applicable for very few patients [4]. In consequence new therapeutic options based on the molecular biology of pancreatic cancer are urgently needed to improve the survival of patients.

The receptor tyrosine kinase cMET and its ligand HGF (hepatocyte growth factor) play an important role in embryogenesis and tissue regeneration [5–7]. Binding of HGF to its corresponding receptor cMET leads to activation of intracellular signalling pathways including MAPK/ERK, PI3K/AKT and FAK (reviewed in [8]). In cancer, this confers multiple effects such as resistance to chemotherapy, induction of angiogenesis and promotion of metastasis (reviewed in [9]). With regards to pancreatic cancer, expression of cMET has been associated with poor survival [10] and phosphorylation of cMET has been described in patients with early distant metastases even after complete surgical resection [11]. Moreover, involvement of cMET activation in resistance to gemcitabine therapy [12], tumour cell motility [13] and secretion of angiogenic factors [14] has been reported in pancreatic cancer. Therefore, targeting cMET might be a promising approach for anti-neoplastic therapy in this devastating tumour entity.

INC280 [(also known as INCB028060); 2-fluoro-N-methyl-4-(7-(quinolin-6-ylmethyl)imidazo[1,2-b][1,2,4]triazin-2-yl)benzamide] is an orally available, small molecule ATP competitive inhibitor of cMET. It is selective for cMET, but also impairs positive (cMET-mediated) regulation of EGFR (epidermal-growth factor receptor) and has shown potent anti-neoplastic activity in preclinical studies [15]. In addition, a dose-escalating clinical phase I study showed manageable toxicity and promising dose-dependent decreases in cMET phosphorylation (NCT01072266). Currently, phase I and II studies for patients with advanced solid malignancies (NCT01911507, NCT01546428, NCT01324479), hepatocellular carcinoma (HCC), non-small cell lung cancer (NSCLC), renal cell carcinoma and melanoma have been launched (NCT01737827, NCT01610336, NCT01820364). Hence, targeting cMET with INC280 might also be a promising treatment option for human pancreatic cancer.

In the present study, we assessed the anti-neoplastic activity of targeting cMET with INC280 in pancreatic cancer models and found substantial *in vitro* inhibition of HGF-induced cancer cell motility and –signaling, as well as reversal of resistance-mediating properties. To validate our findings *in vivo*, we initially used an orthotopic xenogeneic mouse model and, subsequently, an orthotopic syngeneic mouse model, since the latter model harbors a functional immune system. Evaluation of INC280 in combination with gemcitabine on tumour growth in these experimental murine models provide *in vivo* evidence that targeting cMET has potential that could be applied to improve outcomes in patients with pancreatic cancer.

Methods

Cell culture and reagents

Human pancreatic cancer cell lines BxPC-3, MiaPaCa2, HPAF-II (American Type Culture Collection), L3.6pl (kindly provided by Dr. I. J. Fidler (The University of Texas M.D. Anderson Cancer Center)) and murine Panc02 cells (kindly provided by Prof. V. Schmitz (University of Bonn, Germany)) were used. Human endothelial cells (endothelial cells, ECs) and vascular smooth muscle cells (VSMCs) were purchased from Promocell (Heidelberg, Germany). Cells were cultured in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; PAA Laboratories, Coelbe, Germany) supplemented with 15% FCS (fetal calf serum) maintained in 5% CO₂ at 37°C as described. Human HGF was purchased from Peprotech (Hamburg, Germany). cMET inhibitor INC280 was kindly provided by Novartis Oncology (Basel, Switzerland) and dissolved in DMSO (*in vitro* use). For *in vivo* use, a stock solution with 0.5% methylcellulose and 0.1% Tween80 (Sigma-Aldrich, Munich, Germany) was prepared and further dissolved with water according to the manufacturer's protocol. Mice received INC280 always via oral gavage around 1 p.m.. For hypoxia-mimicking, deferroxamine-mesylate (100 µM, DFX; Sigma-Aldrich) was used. Gemcitabine was purchased from our local pharmacy at the University of Regensburg. For *in vivo* use, mice received gemcitabine via i.p. injection in the afternoon.

To obtain cancer cell lines with acquired resistance to gemcitabine *in vitro*, MiaPaCa2 cells were treated with increasing doses of gemcitabine, starting from 10 nM up to 250 nM. Cells were subsequently named MiaPaCa2 (G250).

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT) bromide assays

To evaluate cytotoxic effects of INC280, cells were seeded in 96-well plates (1×10^3 /well) and exposed to various concentrations of INC280. Experiments were performed in complete medium and upon serum-starvation ± HGF

(50 ng/ml). We used the MTT assay to assess cell viability as described before [16,17].

Migration assays

Migration assays with Boyden chambers (Becton Dickinson Bioscience, Heidelberg, Germany) were performed as reported [16,18]. HGF (50 ng/ml) or 15% FCS served as chemoattractant. After 24 hours, tumour cells were fixed and migrated cells stained (Diff-Quick reagent; Dade Behring, Newark, NJ). Migration assays with ECs and VSMCs were performed for 6 hours; cells that migrated through the filters were counted in four random fields and average numbers were calculated.

Western blot analyses for activated signaling pathways and HIF-1 α

Experiments were performed at a cellular density of 60% to 70%. Unless otherwise indicated, cells were incubated with increasing doses of INC280 (100, 500, 1000 nM) for 4 or 24 hours before stimulation with HGF (50 ng/ml) for 15 minutes. Whole-cell lysates were prepared as described before [17]. Membranes were sequentially probed with antibodies against phospho-Akt^{Ser473}, Akt, phospho-ERK^{Thr202/Tyr204}, ERK, phospho-cMET^{Tyr1349}, cMET, phospho-FAK^{Tyr925}, FAK (Cell Signaling, Beverly, MA), HIF-1 α (Novus Biologicals, Littleton, CO) and β -actin (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA). For detection of HIF-1 α , MiaPaCa2(G250) cells were incubated for 24 hours with INC280 (500 nM) \pm DFX (100 μ M) as described [19]. Antibodies were detected by enhanced chemiluminescence (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ).

PCR analysis for MDR-1 expression

Expression of MDR-1 upon cMET inhibition with INC280 was determined by real-time PCR. Preparation of cDNA was performed as described [20]. Selected primer pairs for PCR were as follows: MDR-1 (5-TG GCCTTaTTTGTGTTGGTG and 3-ATCATTGGCG AGCCTGGTAGTC) and 18S (5'-GTAACCCGTTGAA CCCCATT and 3'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG). Primers were optimized for MgCl₂ and annealing, and PCR products were confirmed by gel electrophoresis. RT-PCR was done using the LightCycler system and Roche Fast-Start Light Cyclers-Master Hybridization Probes master mix (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

Enzyme-linked immunosorbent assay for VEGF-A and PDGF-B

To determine changes in VEGF-A we used an ELISA kit specific for human VEGF-A (BioSource Europe, Nivelles, Belgium), as reported [20]. Pancreatic cancer cells were plated at 40-50% density and incubated with or without

INC280 (500nM) and stimulated with DFX for 24 hours. Similar, PDGF-B was determined using an ELISA kit specific for human PDGF-B (Peprotech, Hamburg, Germany). Analyses of culture supernatants were performed according to the manufacturer's protocol.

Animal models

Experiments were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Regensburg and the regional authorities. In addition, experiments were conducted according to "Guidelines for the Welfare of Animals in Experimental Neoplasia" published by The United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research. Mice were housed in cages (n = 5 per unit) with tap water and food *ad libitum*. In addition, animals were assessed daily for tumour-associated symptoms and body weight was determined every other day. Effects of cMET inhibition with INC280 were first evaluated in an orthotopic pancreatic cancer model using human L3.6pl cancer cells. Briefly, 1×10^6 L3.6pl cells were injected into the pancreatic tail of eight-week-old male athymic nude mice (BALB/c^{nu/nu}, Charles River, Germany). Mice were randomized into 3 groups (n = 8–12/group) receiving either vehicle (controls) or INC280 (10 mg/kg/d or 20 mg/kg/d) by oral gavage based on previously reported dosing schedules [15]; treatment started 7 days after tumour cell inoculation. Mice were sacrificed after 28 days, tumours were excised, weighed, and incidence of macroscopically visible liver and lymph node metastases was determined. Subsequently, the effects of cMET inhibition with INC280 on growth of murine pancreatic cancer cells (Panc02) were confirmed in an orthotopic syngeneic model. Briefly, 2.5×10^5 Panc02 pancreatic cancer cells were injected into the pancreatic tail of eight-week-old male C57BL/6 mice (Charles River, Germany). Mice were randomized into 2 groups (n = 7/group) and treatment with INC280 (10 mg/kg/d) was initiated on day 7 after tumour cell inoculation, according to the treatment schedule for orthotopic L3.6pl cells. Since tumours are more aggressive, the experiment was terminated on day 21 when mice in the control group showed signs of advanced disease. Tumours were excised, weighed, and macroscopically visible lymph node metastases and ascites were determined (Panc02 does not form liver metastases in our hands).

Since gemcitabine is the current chemotherapeutic standard for patients with pancreatic cancer, we next evaluated a gemcitabine dosing that delays, but does not abrogate tumour growth in our murine cancer model (similar to the situation in patients). For this purpose we used a subcutaneous syngeneic tumour model (Panc02, 1×10^5 cells) with mice (n = 5/group) being treated with gemcitabine 50 or 100 mg/kg twice/week. Tumours from the higher dosing group were harvested at the end

of the experiment and cMET expression determined by Western blotting. Based on the results from this model we next assessed the combination of INC280 (10 mg/kg/d) with gemcitabine (100 mg/kg twice/week) in the orthotopic syngeneic mouse model. To obtain a longer treatment period, we reduced the number of cells that were injected into the pancreatic tail to 1×10^5 . Mice were randomized into 4 groups ($n = 7-9$ mice/group) and therapy was initiated on day 7 after tumour cell implantation. On day 27 mice in the control group showed severe signs of tumour disease and, therefore, the experiment was terminated. Tumours were excised, weighed and occurrence of metastases was determined. In addition, tissue was harvested for immunohistochemical analyses.

To determine the efficacy of targeting cMET with INC280 on survival in advanced tumour stages, we first applied a subcutaneous tumour model. 1×10^5 Panc02 cells were injected into the right flank of C57BL/6 mice and randomized to 4 groups ($n = 10$ /group). To imitate the clinical setting in pancreatic cancer, the initial treatment in 20 mice was performed with gemcitabine (100 mg/kg twice/week) when tumours reached a size of 80 mm^3 . Upon progression to approximately 300 mm^3 , INC280 (10 mg/kg/d) was added to 10 mice pretreated with gemcitabine and 10 mice without any treatment. Mice were terminated when tumours reached a size of around 800 mm^3 . Since the local microenvironment has substantial impact on tumour growth and resistance, we finally performed a similar syngeneic orthotopic model. Again, 1×10^5 Panc02 cells were injected into the pancreatic tail and mice were randomized to 4 groups ($n = 10$ /group). Gemcitabine was given from day 10 (100 mg/kg twice/week) and INC280 (10 mg/kg/d) was added to the regime from day 20 after tumour cell injection, based on the results from the subcutaneous model. Mice were terminated as soon as they showed signs of tumour disease.

Immunohistochemical analysis of vascularization, tumour cell proliferation and apoptosis

To determine CD31-positive vessel area, cryosections were obtained. Frozen tissue was fixed in cold acetone and chloroform, washed with PBS and exposed to antibodies against CD31 (1:50; Pharmingen, Germany), and respective secondary antibody (AlexaFluor 488; 1:200). Images were obtained in four different quadrants of each tumour section (2 mm inside the tumour-normal tissue interface) at $20\times$ magnification [16]. Vessel area was determined as pixels/hpf using ImageJ version 1.46r (NIH, USA).

Ki67 staining was performed on paraffin sections. Briefly, slides were deparaffinized in xylene, followed by treatment with a graded series of alcohol washes [100, 95, 70% ethanol/ddH₂O (v/v)], rehydration in

citrate buffer (pH6; Merck, Darmstadt, Germany), and blocking against endogenous peroxidase with H₂O₂. Slides were incubated with Ki67 primary antibody (1:100; abcam, Cambridge, UK) at 4°C overnight. After washing with TBS, secondary antibody (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA) was added to tissue sections followed by incubation with diaminobenzidine (Biozol, Eching, Germany). Negative controls were performed by omitting the primary antibody. Ki67 positive cells were counted in four fields per tumour section at $20\times$ magnification and the average was calculated.

A terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick-end labeling detection kit (TUNEL; Promega Corp., Mannheim, Germany) was used to detect cell apoptosis [20]. Four fields at $20\times$ magnification were selected at the proliferation front in each tumour, and TUNEL positive cells were counted; an average value from these results was calculated.

Statistical analysis

Statistical analyses were done using SigmaStat (Version 3.0). Results of *in vivo* experiments were analyzed for significant outliers using the Grubb's test (www.graphpad.com). Tumour-associated variables of *in vivo* experiments were tested for statistical significance using the Mann-Whitney *U* test for nonparametric data or ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test for more than two groups. The two-sided Student's *t*-test was applied for analysis of *in vitro* data. All results are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM).

Results

Effect of cMET inhibition on pancreatic cancer cells *in vitro*

First, the expression of cMET as the INC280 target was assessed in human pancreatic cancer cell lines. Results showed that cMET is expressed in HPAF-II, BxPC3 and L3.6pl cells, whereas MiaPaCa2 did not show detectable expression (Figure 1A). Next, the effects of targeting cMET with INC280 on growth of pancreatic cancer cell lines were determined *in vitro*. Using MTT assays a slight, but significant, dose-dependent growth inhibition of HPAF-II was found only when cells were stimulated with HGF (Figure 1B). Subsequently, migration assays showed that cMET blockade significantly impairs HGF-induced motility but had no effect on constitutive migration in HPAF-II cells (Figure 1C). Last, we determined the impact of INC280 on activation of oncogenic signaling pathways. Incubation of HPAF-II cells with INC280 for 4 hours or 24 hours did not affect constitutive Akt, ERK or FAK phosphorylation. While no constitutive cMET phosphorylation was observed upon these conditions, stimulation with HGF for 15 minutes led to

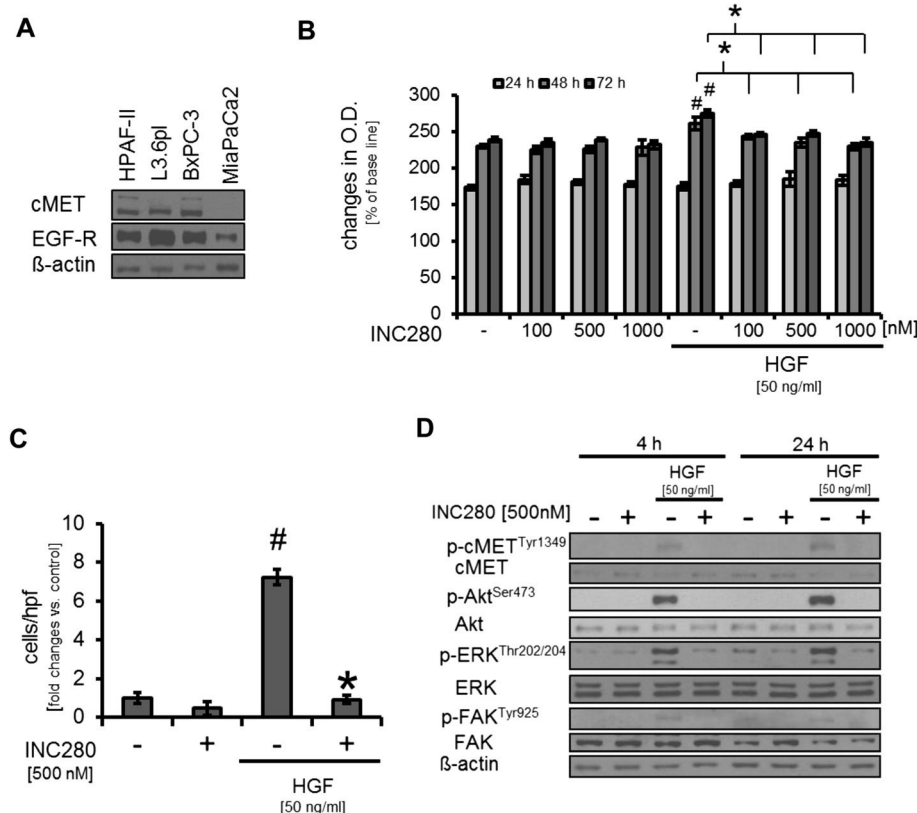


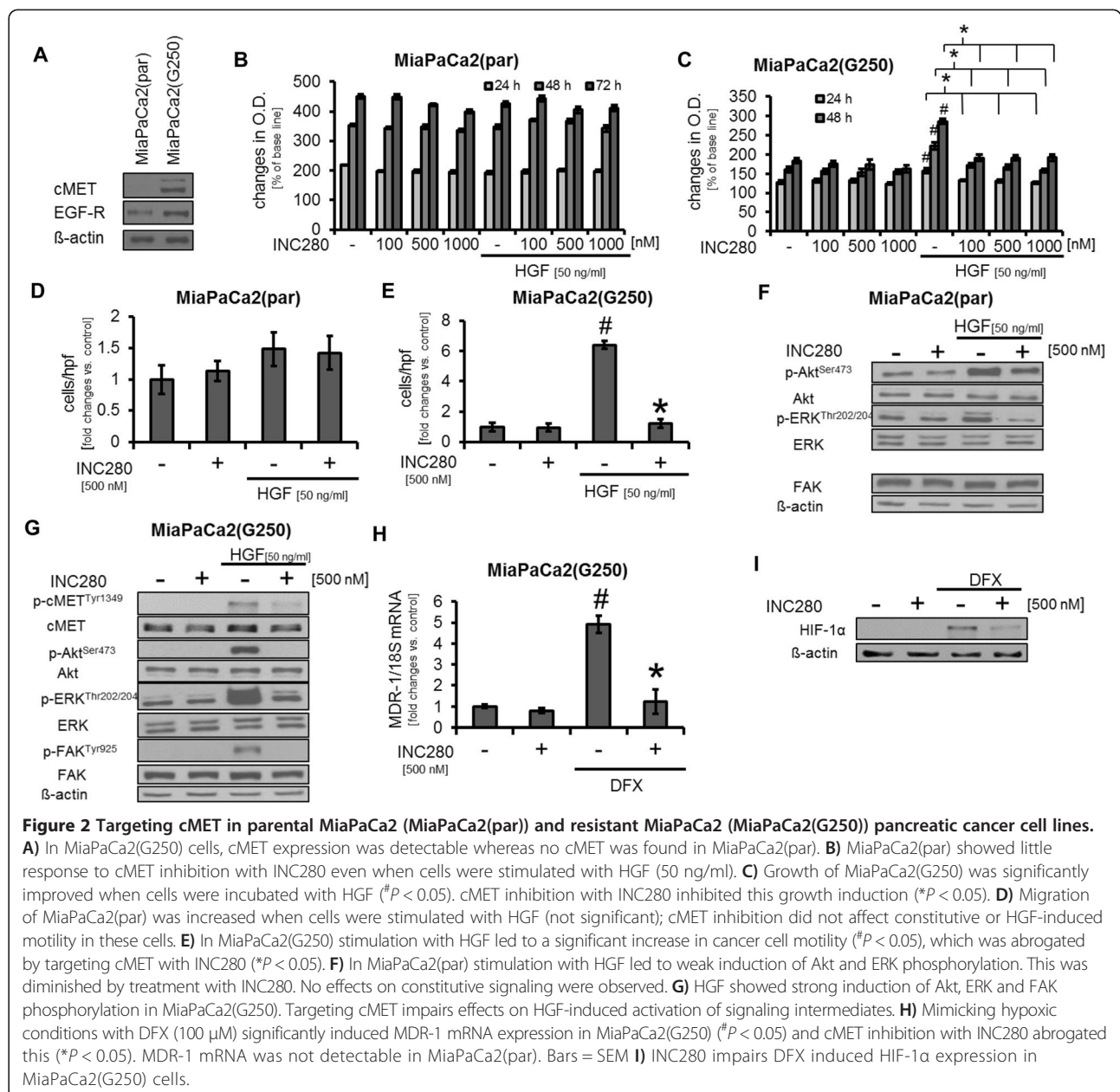
Figure 1 Effects of targeting cMET on pancreatic cancer cells. A) cMET expression was detectable in HPAF-II, L3.6pl, BxPC3 but not in parental MiaPaCa2 pancreatic cancer cell lines. **B)** Incubation of HPAF-II cells with the cMET inhibitor INC280 has no effect on constitutive growth. When cells were stimulated with HGF, a significant growth increase was observed ($^{\#}P < 0.05$). This was abrogated by cMET inhibition with INC280 ($^{*}P < 0.05$). **C)** HGF induces cancer cell motility ($^{\#}P < 0.05$) that can be efficiently blocked by INC280 ($^{*}P < 0.05$). Constitutive motility remains unaffected. **D)** Treatment with INC280 disrupts HGF-mediated phosphorylation of Akt, ERK and FAK after 4 and 24 hours of treatment. Results in 1B-1D are shown for HPAF-II; similar results were obtained from L3.6pl and Panc02. Bars = SEM.

phosphorylation of cMET, Akt, ERK and FAK. Pretreatment with INC280 completely abrogated this effect (Figure 1D). The described observations were subsequently confirmed in the L3.6pl human pancreatic cancer cell line (Additional file 1: Figure S1A-C); FAK phosphorylation was not detectable in L3.6pl and therefore not shown. In addition, we used the murine pancreatic cancer cell line Panc02 to confirm these results (data not shown). Taken together, our results show that treatment with INC280 efficiently abrogates HGF-induced motility and oncogenic signaling in pancreatic cancer cell lines *in vitro*.

Impact of targeting cMET on gemcitabine-resistant cancer cells *in vitro*

The pancreatic cancer cell line MiaPaCa2 confers a certain resistance against gemcitabine which is the accepted standard for systemic treatment in pancreatic cancer [21,22]. To further enforce this resistance, MiaPaCa2 cells were treated with increasing doses of gemcitabine starting from 10 nM up to 250 nM. Interestingly,

although no cMET expression was detectable in the native cell line, MiaPaCa2 cells treated with gemcitabine showed strong expression of cMET and a slight increase in EGFR expression (Figure 2A). Subsequently, we compared the properties of native (parental) MiaPaCa2 cells (also named MiaPaCa2(par)) with those pretreated with gemcitabine (named MiaPaCa2(G250)) with regards to cMET inhibition with INC280. In MTT assays, MiaPaCa2(par) did not respond to HGF stimulation and thus to cMET inhibition with INC280, as one would expect because of the missing cMET receptor (Figure 2B). In contrast, HGF strongly induced growth of MiaPaCa2(G250) and INC280 significantly impaired this (Figure 2C). Migration assays showed that HGF tended to increase cancer cell motility in MiaPaCa2(par), but INC280 did not affect either constitutive or HGF-induced motility (Figure 2D). In MiaPaCa2(G250) HGF led to a more than 6-fold increase in motility which was abrogated by cMET blockade (Figure 2E). Finally, Western blotting from MiaPaCa2(par) showed only modest phosphorylation



of ERK and Akt upon HGF stimulation and INC280 had only minor effects on Akt but impaired ERK phosphorylation (Figure 2F). In MiaPaCa2(G250), a strong phosphorylation of Akt, ERK and FAK upon stimulation with HGF was detected, which was strongly inhibited by INC280 (Figure 2G). Next, we assessed the expression of MDR-1 as a known mediator of multidrug-resistance [23,24]. Interestingly, MiaPaCa2(par) do not express MDR-1 mRNA, whereas MiaPaCa2(G250) showed MDR-1 mRNA expression which was strongly induced upon incubation with hypoxia-mimicking DFX. Treatment with INC280 significantly reduced MDR-1 mRNA expression in MiaPaCa2(G250) cells (Figure 2H). Searching for

the mechanism of MDR-1 regulation, we found that expression of hypoxia-induced HIF-1 α , a major regulator of MDR-1 and stromal factors such as VEGF-A, is impaired by cMET inhibition in MiaPaCa2(G250) (Figure 3I). In conclusion, these results indicate that cMET expression is involved in resistance to gemcitabine and INC280 effectively inhibits HGF-induced effects in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cell lines.

Modulation of stromal factors in pancreatic cancer cell lines *in vitro*

Since cancer cells are a major source of factors that influence the microenvironment [25], we next determined

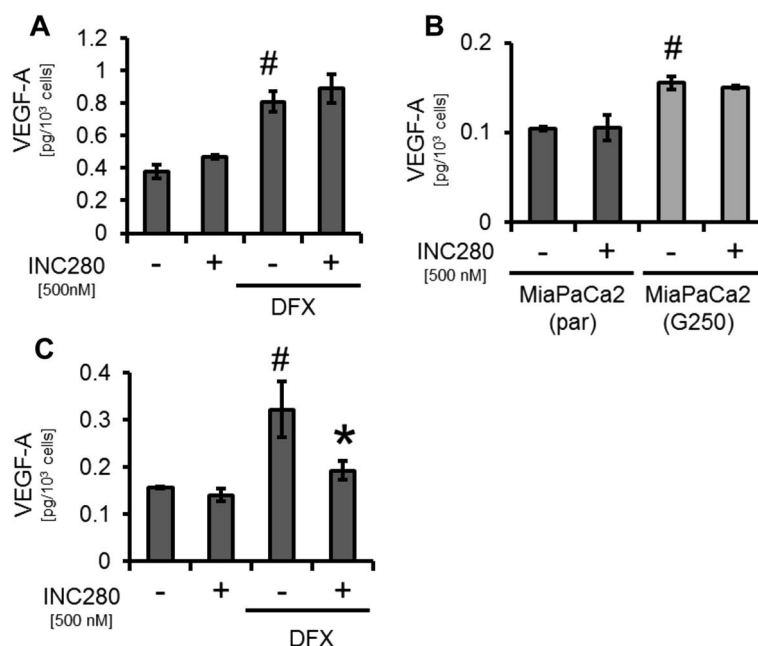


Figure 3 Effects on VEGF-A secretion by cMET inhibition. **A)** cMET inhibition had no effect on constitutive or DFX-induced VEGF-A secretion by HPAF-II pancreatic cancer cells ($^{\#}P < 0.05$). **B)** MiaPaCa2(G250) showed a significant increase in VEGF-A production compared to MiaPaCa2(par) ($^{\#}P < 0.05$). However, INC280 has no effect on constitutive VEGF-A secretion in either MiaPaCa2(par) or gemcitabine-resistant MiaPaCa2(G250). **C)** Hypoxia-mimicking DFX significantly induced VEGF-A secretion from MiaPaCa2(G250) ($^{\#}P < 0.05$). Targeting cMET significantly impaired this effect ($^*P < 0.05$). Bars = SEM.

whether cMET inhibition affects secretion of VEGF-A and PDGF-B in cancer cell lines. Using ELISAs for VEGF-A and PDGF-B, we found no effect of targeting cMET on secretion of both in HPAF-II and L3.6pl even when cells were stimulated with hypoxia-mimicking DFX (Figure 3A and Additional file 2: Figure S2B for HPAF-II, Additional file 2: Figure S2A and 2C for L3.6pl). Interestingly, we detected an increase in VEGF-A and PDGF-B secretion in MiaPaCa2(G250) cells compared to MiaPaCa2(par). Nonetheless, INC280 had no effect on constitutive secretion of both factors in MiaPaCa2(par) or in MiaPaCa2(G250), suggesting that other cMET-independent mechanisms are involved in this up-regulation (Figure 3B, Additional file 2: Figure S2D). Finally, we assessed the effect of cMET inhibition on hypoxia-induced VEGF-A secretion in MiaPaCa2(G250) since INC280 led to inhibition of HIF-1 α in these cells. Results showed a strong DFX-induced increase in VEGF-A secretion that was significantly impaired by cMET blockade (Figure 3C). Regarding PDGF-B, incubation with DFX also led to a significant induction of protein secretion, but this was not affected by cMET blockade (Additional file 2: Figure S2E). Together, these results suggest that targeting cMET in pancreatic cancer cell lines has no effect on VEGF-A and PDGF-B secretion. However, the secretion of VEGF-A in gemcitabine-resistant cells might be affected by cMET inhibition via inhibition of HIF-1 α .

Targeting cMET in stromal components (ECs, VSMCs) *in vitro*

Pancreatic cancer is characterized by a strong stromal reaction. Therefore, we subsequently examined the effects of cMET inhibition on ECs and VSMCs. MTT assays in ECs under serum-starved conditions and stimulation with HGF, showed a slight but significant increase in growth that was diminished by INC280 (Additional file 3: Figure S3B). No effect upon constitutive conditions was observed (Additional file 3: Figure S3A). EC motility was significantly increased upon incubation with HGF, which was strongly reduced by INC280 (Figure 4A). Regarding activation of signaling pathways, treatment with INC280 strongly inhibited HGF-induced activation of Akt and ERK whereas no effects on constitutive Akt and ERK phosphorylation were found (Figure 4B). Taken together, these results show that INC280 affects ECs only when these cells are stimulated with HGF.

Next we analyzed the impact of INC280 on VSMCs. MTT assays showed a dose-dependent inhibition of VSMC growth starting from INC280 (100nM) after 72 hours of incubation (Additional file 3: Figure S3C). In contrast to ECs, stimulation with HGF upon serum-starved conditions had no effect on VSMC growth and, accordingly, INC280 did not have a further growth inhibitory effect in MTT assays (Additional file 3: Figure

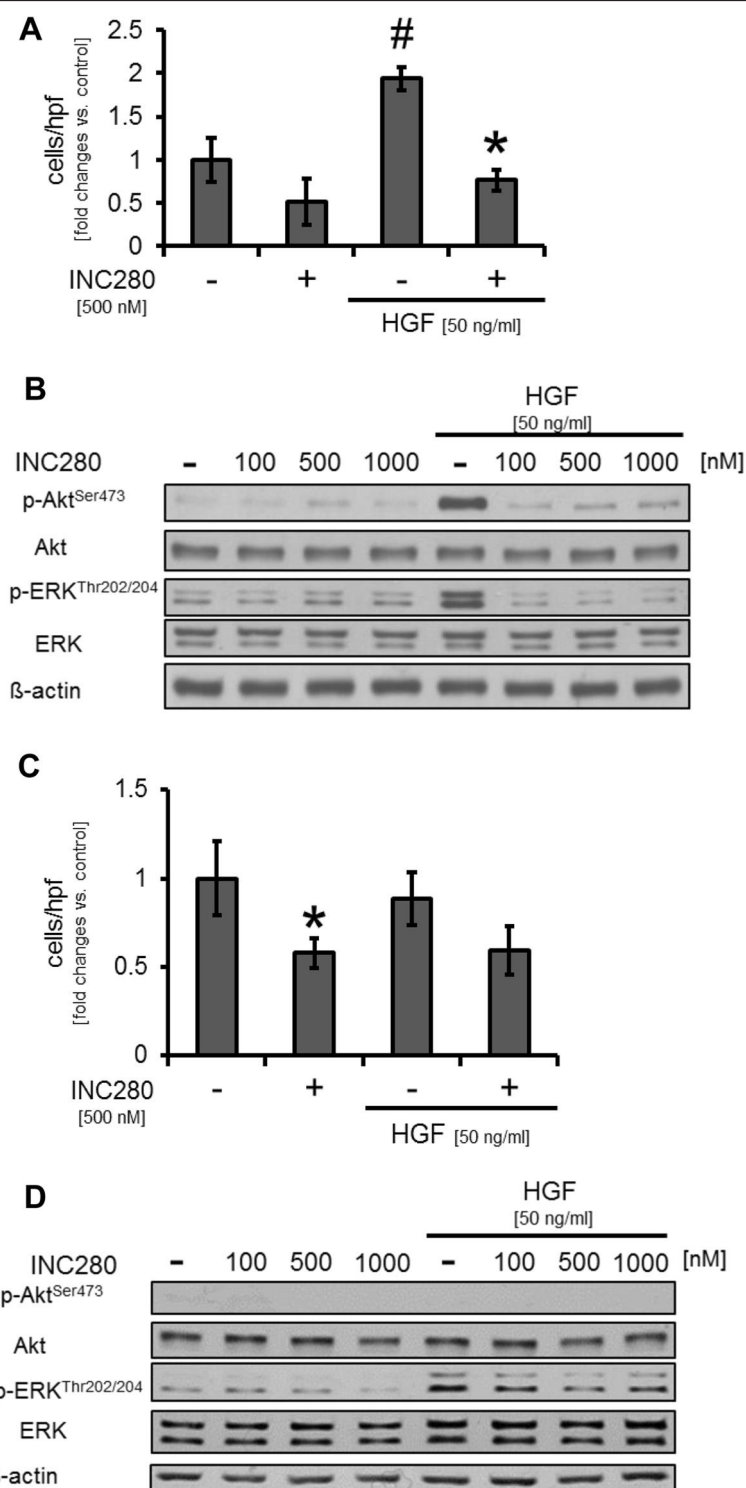


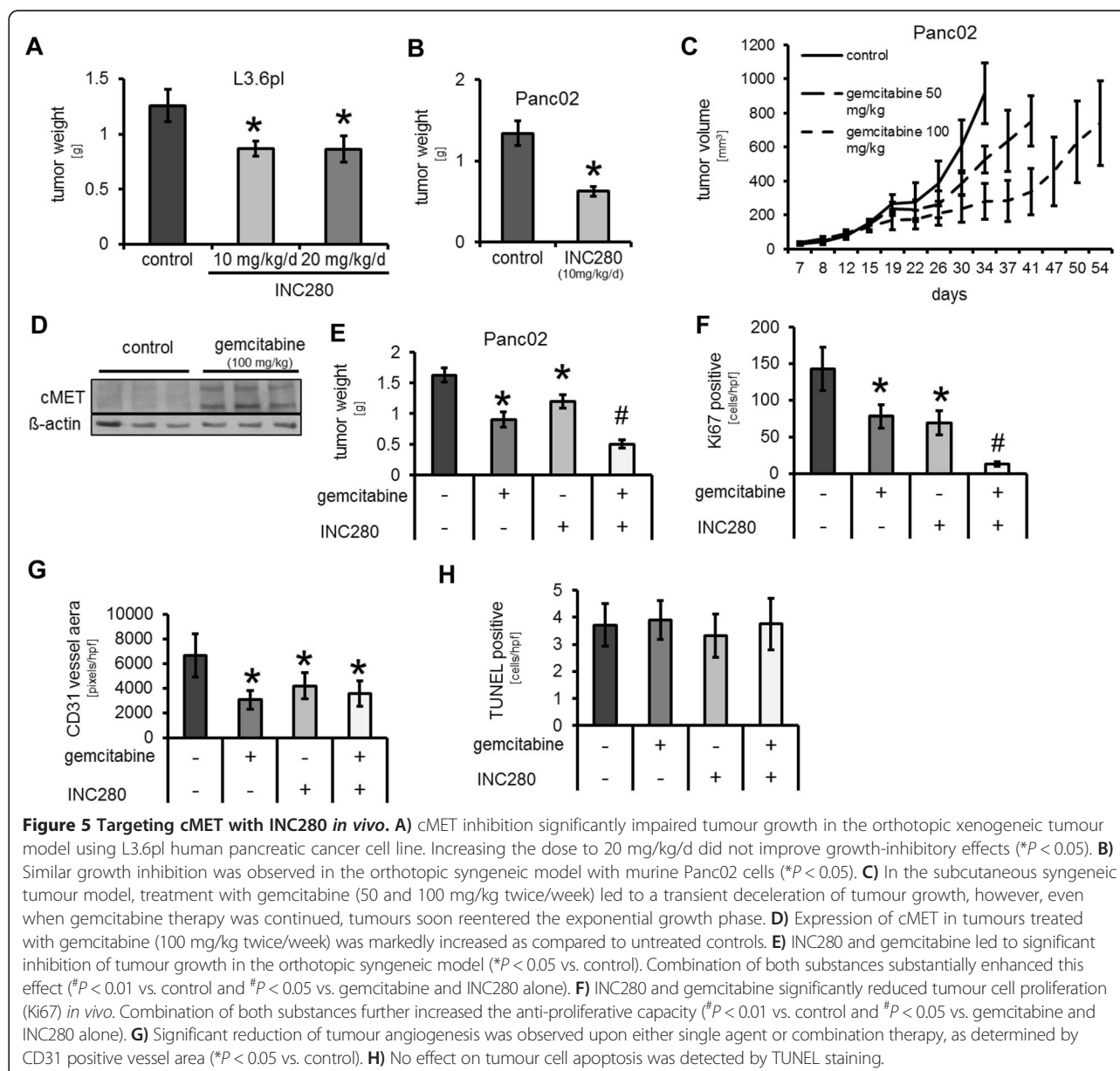
Figure 4 Effects of cMET inhibition on endothelial cells (ECs) and vascular smooth muscle cells (VSMCs). **A)** HGF significantly induced motility of EC *in vitro* ($^{#}P < 0.05$); INC280 impaired this effect ($^{*}P < 0.05$). **B)** cMET inhibition had no effect on constitutive activation of signaling pathways in ECs. However, HGF strongly induces Akt and ERK phosphorylation which can efficiently be inhibited by INC280. **C)** Stimulation with HGF had no effect on motility of VSMCs. However, INC280 impaired constitutive motility of these cells *in vitro* ($^{*}P < 0.05$). **D)** In VSMCs, HGF had minor effects on Akt and ERK phosphorylation *in vitro*. INC280 impairs the effect of HGF, but has no effect on constitutive pathway activation. Bars = SEM.

S3D). Motility upon incubation with HGF in VSMCs was not induced, but targeting cMET with INC280 led to a significant inhibition of constitutive migration (Figure 4C). Finally, Western blotting did not show a substantial effect of INC280 on constitutive Akt phosphorylation and only a minor impact on ERK phosphorylation in VSMCs (Figure 4D). These results indicate that HGF does not affect VSMCs and cMET inhibition with INC280, therefore, has only minor effects on these cells.

Targeting cMET impairs tumour growth *in vivo*

Our results so far suggest that cMET inhibition with INC280 might be effective against pancreatic cancer

cells. To further address this issue we used an orthotopic xenograft model with metastatic L3.6pl pancreatic cancer cells. To elucidate a potential dose-dependent effect, treatment with INC280 (10 and 20 mg/kg/d) was initiated 7 days after tumour cell inoculation. Results showed a significant reduction of final tumour weight after 28 days in both treatment groups, compared to control (Figure 5A). However, no difference between the 10 mg/kg/d and the 20 mg/kg/d group was noted. Therefore, 10 mg/kg/d was selected as the effective dose in follow-up experiments. Notably, we also found a trend towards reduced liver metastases upon cMET blockade, although this did not reach statistical significance (Table 1). Moreover, enlarged



lymph nodes were detected in 8/12 (66%) mice in the control group, but only 3/10 (30%) in the 10 mg/kg/d group and 2/8 (25%) in the 20 mg/kg/d group (Table 1); these results only describe a trend, since statistical significance was not reached. Nonetheless, this is of particular importance since lymph nodes are the primary site of metastasis in pancreatic cancer. To confirm the growth inhibitory effects of INC280, we subsequently used the syngeneic orthotopic model with murine Panc02 cells (2.5×10^5 cells). Results again showed that cMET inhibition (10 mg/kg/d) significantly impairs tumour growth on day 21 (Figure 5B). In this model we also found a trend towards reduction of lymph node metastases similar to the orthotopic xenogeneic model (Table 1). We were not able to examine liver metastases in the Panc02 model since these cells do not form liver metastases in our experience. It should be noted that none of the mice treated with INC280 showed ascites formation (Table 1). In summary, these results clearly demonstrate that targeting cMET with INC280 impairs tumour growth and metastases *in vivo*.

Combination of cMET inhibition with gemcitabine treatment *in vivo*

Since gemcitabine is the standard treatment for pancreatic cancer patients, we next addressed the issue of

combining INC280 with gemcitabine *in vivo*. In accordance to the situation in patients, we first defined a dosing for gemcitabine that has only limited therapeutic efficacy using a subcutaneous syngeneic tumour model (Panc02). Results showed that 50 and 100 mg/kg gemcitabine administered twice/week significantly delays, but does not abrogate, tumour growth in the Panc02 model (Figure 5C). In addition, Western blotting from these tumours revealed an up-regulation of cMET expression upon gemcitabine treatment (Figure 5D). In further experiments, we chose to use gemcitabine 100 mg/kg twice/week in combination with INC280 (10 mg/kg/d). The efficacy of this combination was first assessed in the orthotopic syngeneic model (Panc02, 1×10^5 cells). Simultaneous treatment with INC280 and gemcitabine was initiated 7 days after tumour cell implantation and went on for 20 days. No treatment-associated side effects (e.g. weight loss) were observed (data not shown). After 27 days results revealed a significant reduction of tumour weight in all treatment groups; the combination treatment was most effective showing significant tumour reduction versus both the control and single agent therapy groups (Figure 5E). Immunohistochemical work-up revealed a significant inhibition of tumour cell proliferation (Ki67 staining) in all treatment groups, but the combination treatment was clearly most effective (Figure 5F). Regarding tumour vascularization, CD31 staining revealed a significant reduction in all treatment groups compared to controls, although there was no difference between the different treatment groups (Figure 5G). No effect on tumour cell apoptosis was observed (Figure 5H). Metastases formation was also impaired in this model with only 1/8 mice showing enlarged lymph nodes and no ascites with combined INC280 and gemcitabine treatment (Table 1). These results clearly show the potential therapeutic benefits of combining cMET inhibition with gemcitabine treatment.

Table 1 Metastases formation in the orthotopic pancreatic cancer xenogeneic and syngeneic model

L3.6pl orthotopic model¹				
	Liver metastases		LN metastases	
	Positive	Negative	Positive	Negative
Control (n = 12)	8 (66.7%)	4 (33.3%)	8 (66.7%)	4 (33.3%)
INC280 10 mg/kg/d (n = 10)	5 (50%)	5 (50%)	3 (30%)	7 (70%)
INC280 20 mg/kg/d (n = 8)	4 (50%)	4 (50%)	2 (25%)	6 (75%)
Panc02 orthotopic model²				
	LN metastases		Ascites	
	Positive	Negative	Positive	Negative
Control (n = 7)	4 (57.1%)	3 (42.9%)	4 (57.1%)	3 (42.9%)
INC280 10 mg/kg/d (n = 7)	0	7 (100%)	0	7 (100%)
Panc02 orthotopic model²				
	LN metastases		Ascites	
	Positive	Negative	Positive	Negative
Control (n = 9)	6 (66.7%)	3 (33.3%)	3 (33.3%)	6 (66.7%)
INC280 (n = 7)	1 (14.3%)	6 (85.7%)	1 (14.3%)	6 (85.7%)
gemcitabine (n = 8)	2 (25%)	6 (75%)	2 (25%)	6 (75%)
INC280 + gemcitabine (n = 8)	1 (12.5%)	7 (87.5%)*	0 (0%)	8 (100%)

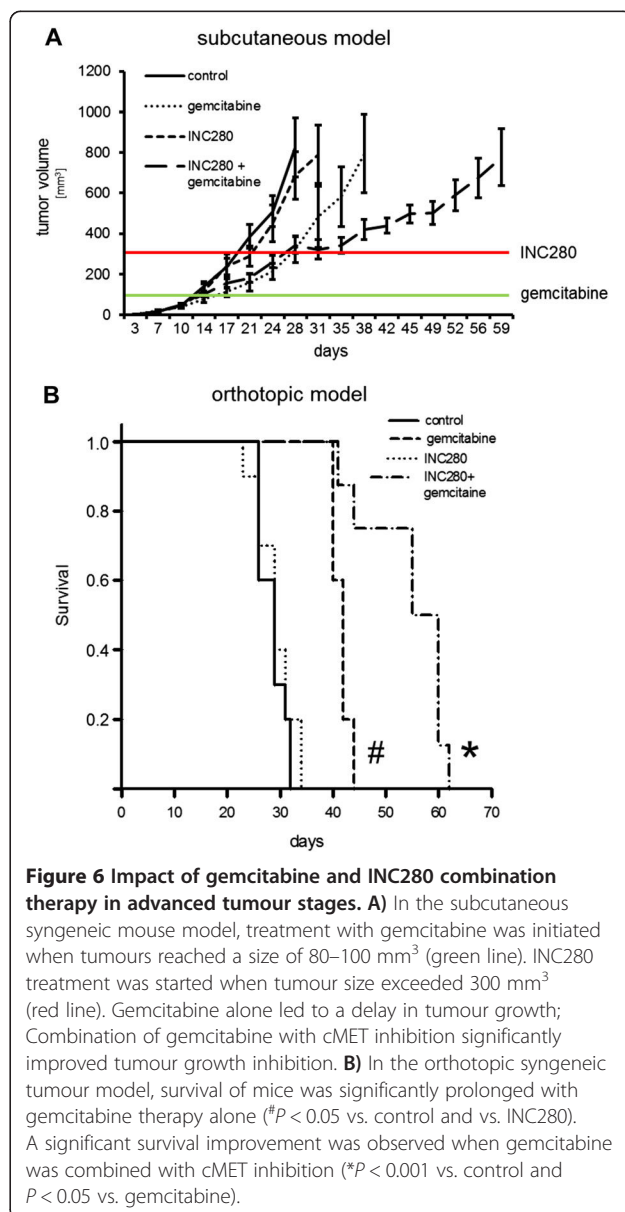
¹does not form ascites in our hands.

²does not form liver metastases in our hands.

* $P < 0.05$ vs. control.

Inhibition of cMET prolongs survival in combination with gemcitabine *in vivo*

The clinical situation shows that more than 80% of patients present with an advanced tumour stage and are initially treated with systemic chemotherapy. We addressed this issue first in a subcutaneous tumour model (Panc02). Gemcitabine treatment (100 mg/kg twice/week) was started when tumours reached a size of 80–100 mm³ (Figure 6A, green line). From our initial experiments with gemcitabine in the subcutaneous tumour model we knew that this leads to delayed tumour growth up to a size of approximately 300 mm³ (Figure 5C). Therefore, we defined tumours >300 mm³ as clinically progressing, and used this threshold to add INC280 as “second line” therapy (Figure 6A, red line). Mice were sacrificed when tumours reached a size of



800 mm³. Results showed that gemcitabine leads to growth delay *in vivo* as expected and delayed initiation of INC280 treatment alone has no effect on tumour growth. In comparison, combined INC280 and gemcitabine treatment was the most effective therapy against tumour progression (Figure 6A). Since the microenvironment has significant impact on tumour growth and resistance to anti-neoplastic therapies, we confirmed these results in the orthotopic syngeneic model (Panc02). In accordance with the subcutaneous model experiments, we initiated gemcitabine (100 mg/kg twice/week) treatment on day 10 and added INC280 (10 mg/kg/d) on day 20. Results from this model showed that INC280 alone has no effect on advanced tumour growth, and gemcitabine significantly improves survival as expected. Consistent with

the subcutaneous model results, the addition of the cMET inhibitor INC280 to tumours pretreated with gemcitabine was the most efficient therapy (Figure 6B). These results strongly support the idea of adding cMET inhibition to gemcitabine treatment, even when the pancreatic cancer is in advanced stages.

Discussion

Pancreatic cancer is still one of the most devastating tumour entities in humans and surgical resection provides the only curative option. However, most patients present in stages where surgery is not an option. Therefore, novel therapeutic opportunities are desperately needed to improve the prognosis. Within the current study we assess the effects of targeting cMET by using a novel orally available ATP-competitive inhibitor in pancreatic cancer models. Our results show that cMET inhibition impairs activation of HGF-induced oncogenic signaling intermediates in human and murine pancreatic cancer cell lines. Moreover, treatment with the cMET inhibitor reduces tumour growth *in vivo* and prolongs survival of mice most effectively when used in combination with gemcitabine. Taken together, our results suggest that targeting cMET might be a novel way to improve outcome of patients with pancreatic cancer.

Low level expression of cMET and HGF is known in the exocrine pancreas. However, when proceeding to PanIN or even invasive ductal adenocarcinomas, expression of both cMET and HGF greatly increases [11,26,27]. Several studies have linked activation of cMET signaling to phosphorylation of intracellular signaling cascades such as PI3K/Akt, MAPK/ERK or FAK in pancreatic cancer models, leading to tumour cell invasiveness, motility and resistance to gemcitabine therapy [12,13,28–31]. Within the current study, we confirm that treatment of cancer cell lines with the cMET inhibitor INC280 significantly impairs HGF-induced growth and motility of tumour cells, at least in part via inhibition of Akt, ERK and FAK phosphorylation. Of note, there was no effect detected on growth, motility and signaling intermediates in cancer cell lines under constitutive conditions. This is of particular importance since the stroma is known to be a major source of HGF and Ide *et al.* showed that HGF expression in the stroma of pancreatic cancer specimens is associated with poor prognosis in these patients [32]. Hence, phosphorylation of oncogenic signaling cascades in pancreatic cancer cells via paracrine activation of the cMET receptor might contribute to pancreatic cancer aggressiveness. Therefore, it seems logical that targeting cMET with INC280 would negate this mechanism.

A major issue in pancreatic cancer therapy is its resistance to almost every systemic therapy. Gemcitabine, which was for many years considered to be the standard therapy for pancreatic cancer, only has response rates

between 5.6 and 13.3% [33]. Novel therapeutic regimes such as FOLFIRINOX show response rates only around 30% and come at a cost of high toxicity in more than 50% of patients [4]. Previous studies have connected the resistance of pancreatic cancer cell lines to gemcitabine, with alterations in EMT (epithelial-to-mesenchymal transition) that include the cMET receptor [34]. Moreover, a report by Li and coworkers defined cMET as a marker for pancreatic cancer stem cells (CSC) with a high self-renewal capacity [35]. Recently, Hage and colleagues demonstrated that treatment with cabozantinib, a dual inhibitor of cMET and VEGFR-2, increases the efficacy of gemcitabine, even when cells were resistant to this agent [12]. In our experiments MiaPaCa2 pancreatic cancer cells also show an increase in cMET expression when resistant to gemcitabine (MiaPaCa2(G250)). Moreover, the cMET receptor seems to be functionally active since incubation with HGF induces growth, motility and phosphorylation of intracellular signaling cascades in these cells. Interestingly, MiaPaCa2(G250) cells that are resistant to gemcitabine express MDR-1 mRNA which is in contrast to normal MiaPaCa2(par); MDR-1 is up-regulated in MiaPaCa2 (G250) cells under hypoxic conditions. This is of particular importance since expression of MDR-1 and its encoding protein P-gp have been implicated in reduced drug up-take, thereby mediating resistance to chemotherapy [36,37]. Regulation of MDR-1 has been linked to HIF-1 activation/stabilization and previous reports indicate that cMET blockade impairs this transcription factor in cancer cells [38,39]. Indeed, we found a reduction of HIF-1 α upon cMET inhibition in MiaPaCa2(G250) cells. In conclusion, treatment with the cMET inhibitor INC280 impairs both hypoxia-induced MDR-1 expression and HGF-mediated effects on growth, motility and signaling intermediates in gemcitabine resistant cancer cells *in vitro*. One might speculate that treatment with gemcitabine leads to selection of cancer cells (potentially cancer stem cells) with high cMET expression, thereby providing a rationale for the use of cMET inhibitors in pancreatic cancer at least when tumours become gemcitabine resistant.

We used syngeneic orthotopic pancreatic cancer models to further evaluate our findings. The advantage of these models is the existence of a functional immune system in the host, and the presence of a proper local microenvironment [40]. As predicted from our *in vitro* data, combination of gemcitabine with the cMET inhibitor INC280 was far superior to single agent therapy in terms of tumour inhibition in the orthotopic model. Interestingly, this effect correlated to inhibition of tumour cell proliferation, with no difference in tumour cell apoptosis detected; these results are consistent with growth inhibition caused by the combination of gemcitabine and cMET inhibitor previously reported by Li *et al.* [35]. However, in contrast to

our study, Li and coworkers used immunocompromised NOD/SCID mice with primary human pancreatic adenocarcinoma cells. Regarding apoptosis, a study by Hage and coworkers described a significant increase *in vitro* when pancreatic cancer cell lines were treated with a cMET inhibitor in combination with gemcitabine [12]. However, these results were not confirmed by *in vivo* experiments. Taken together, our study substantiates the rationale for the use of cMET inhibitors in combination to gemcitabine in patients with pancreatic cancer.

The clinical situation shows that most patients present in an advanced stage of disease, necessitating the use of models that address this situation. We were particularly optimistic about the strategy to use cMET inhibitors since we found that tumours of mice treated with gemcitabine strongly up-regulate the cMET receptor. To mimic the clinical situation, we chose to apply INC280 at an advanced tumour stage in the syngeneic orthotopic survival model. Importantly, adding the cMET inhibitor at a progressive tumour growth stage, together with gemcitabine therapy, produced significantly prolonged survival in mice. These results are in line with a recently published study by Avan and colleagues showing a significant improvement in survival when combining gemcitabine with the ATP-competitive cMET inhibitor crizotinib in mice bearing primary pancreatic ductal adenocarcinoma specimen [28]. In contrast to Avan and coworkers who simultaneously started treatment with the inhibitor and gemcitabine 5 days after tumour implantation, we selected an even later time point to begin INC280 treatment (20 days after tumour cell inoculation), and initiated gemcitabine earlier at 10 days. Since gemcitabine remains a “first-line” therapy, and other treatments are typically considered after the tumour shows resistance, we feel the experimental model we used is closer to the clinical situation.

Conclusion

In summary, the present study shows that targeting cMET may lead to an effective inhibition of tumour growth in pancreatic cancer, even in advanced tumour stages. Particularly, inhibition of gemcitabine-resistance in tumour cells by cMET inhibitors may improve current anti-neoplastic therapy strategies for the treatment of pancreatic cancer patients.

Additional files

Additional file 1: Figure S1. Effects of targeting cMET on L3.6pl pancreatic cancer cells. A) Incubation of L3.6pl cells with the cMET inhibitor INC280 has no effect on constitutive growth. When cells were stimulated with HGF, a significant improvement of growth was observed ($\#P<0.05$). This was abrogated by cMET inhibition with INC280 ($\#P<0.05$). B) HGF induces cancer cell motility ($\#P<0.05$) that can efficiently be blocked by INC280 ($\#P<0.05$). Constitutive motility remains unaffected. C)

Treatment with INC280 disrupts HGF-mediated phosphorylation of Akt and ERK after 4 and 24 hours of treatment. Bars=SEM.

Additional file 2: Figure S2. Effects of targeting cMET on VEGF-A and PDGF-B secretion from cancer cells. A) Hypoxia led to a significant increase in VEGF-A secretion from L3.6pl cancer cells ($\#P<0.05$). INC280 did not affect this. B) Induction with DFX led to a significant increase in PDGF-B secretion from HPAF-II pancreatic cancer cells ($\#P<0.05$). Targeting cMET had no impact on this. C) Similar, DFX led to increase in PDGF-B secretion from L3.6pl and INC280 did not reduce this *in vitro* ($\#P<0.05$). D) Gemcitabine resistant MiaPaCa2(G250) showed a higher secretion of PDGF-B compared to regular MiaPaCa2(par) ($\#P<0.05$). cMET inhibition had no effect on this *in vitro*. E) Incubation with DFX led to a significant increase in PDGF-B secretion from MiaPaCa2(G250) but INC280 did not affect this increase ($\#P<0.05$). Bars=SE.

Additional file 3: Figure S3. Effects of targeting cMET on ECs and VSMCs. A) No effect of targeting cMET with INC280 on ECs was detected upon constitutive conditions. B) HGF induces growth of ECs after 48 and 72 hours of incubation ($\#P<0.05$). Incubation with INC280 impairs this ($\#P<0.05$). C) In VSMCs, INC280 led to inhibition of constitutive growth upon constitutive conditions ($\#P<0.05$). D) Upon serum-starved conditions, no effect on constitutive growth was detectable. Similar, stimulation of VSMCs with HGF did not affect *in vitro* growth. Bars = SE.

Abbreviations

MAPK: Mitogen-activated protein kinase; ERK: Extracellular signal-regulated kinase; DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium; FCS: Fetal calf serum; HGF: Hepatocyte growth factor; PDGF: Platelet derived growth factor; VEGF: Vascular endothelial growth factor; FAK: Focal adhesion kinase; MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT) bromide assays; ECs: Endothelial cells; VSMCs: Vascular smooth muscle cells; DFX: Desferrioxamine; hpf: High-power field.

Competing interests

The study was financially in part supported by Novartis Oncology with a contribution to animal costs and consumables.

Authors' contributions

FB performed acquisition, analysis and interpretation of data, took part in drafting of the manuscript and statistical analyses. KS participated in the animal experiments and western blotting. CW carried out *in vitro* experiments and participated in the animal experiments. JR carried out immunohistochemistry and participated in the animal experiments. HJS participated in the design of the study and drafting of the manuscript. EKG participated in the design of the study and drafting of the manuscript. SAL conceived the study, participated in its design and coordination as well as data acquisition, interpretation and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors thank Marvin Anders for excellent technical assistance. Financial support: These studies were supported in part by the German Research Council (Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) to SAL). Moreover, the study was partly supported by Novartis Oncology with a contribution to cost of consumables and animals.

Received: 22 December 2014 Accepted: 30 January 2015

Published online: 19 February 2015

References

- Malvezzi M, Bertuccio P, Levi F, La Vecchia C, Negri E. European cancer mortality predictions for the year 2013. *Ann Oncol*. 2013;24:792–800.
- Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin*. 2013;63:11–30.
- Stathis A, Moore MJ. Advanced pancreatic carcinoma: current treatment and future challenges. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010;7:163–72.
- Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouche O, Guimbaud R, Becouarn Y, et al. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med*. 2011;364:1817–25.
- Bladt F, Riethmacher D, Isenmann S, Aguzzi A, Birchmeier C. Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature*. 1995;376:768–71.
- Chmielowiec J, Borowiak M, Morkel M, Stradal T, Munz B, Werner S, et al. c-Met is essential for wound healing in the skin. *J Cell Biol*. 2007;177:151–62.
- Huh CG, Factor VM, Sanchez A, Uchida K, Conner EA, Thorgerisson SS. Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:4477–82.
- Blumenschein Jr GR, Mills GB, Gonzalez-Angulo AM. Targeting the hepatocyte growth factor-cMET axis in cancer therapy. *J Clin Oncol*. 2012;30:3287–96.
- Gherardi E, Birchmeier W, Birchmeier C, Vande Woude G. Targeting MET in cancer: rationale and progress. *Nat Rev Cancer*. 2012;12:89–103.
- Zhu GH, Huang C, Qiu ZJ, Liu J, Zhang ZH, Zhao N, et al. Expression and prognostic significance of CD151, c-Met, and integrin alpha3/alpha6 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Dig Dis Sci*. 2011;56:1090–8.
- Park JK, Kim MA, Ryu JK, Yoon YB, Kim SW, Han HS, et al. Postoperative prognostic predictors of pancreatic ductal adenocarcinoma: clinical analysis and immunoprofile on tissue microarrays. *Ann Surg Oncol*. 2012;19:2664–72.
- Hage C, Rausch V, Giese N, Giese T, Schonsiegel F, Labsch S, et al. The novel c-Met inhibitor cabozantinib overcomes gemcitabine resistance and stem cell signaling in pancreatic cancer. *Cell Death Dis*. 2013;4:e627.
- Bauer TW, Somcio RJ, Fan F, Liu W, Johnson M, Lesslie DP, et al. Regulatory role of c-Met in insulin-like growth factor-I receptor-mediated migration and invasion of human pancreatic carcinoma cells. *Mol Cancer Ther*. 2006;5:1676–82.
- Hill KS, Gaziova I, Harrigal L, Guerra YA, Qiu S, Sastry SK, et al. Met receptor tyrosine kinase signaling induces secretion of the angiogenic chemokine interleukin-8/CXCL8 in pancreatic cancer. *PLoS One*. 2012;7:e40420.
- Liu X, Wang Q, Yang G, Marando C, Koblish HK, Hall LM, et al. A novel kinase inhibitor, INCB28060, blocks c-MET-dependent signaling, neoplastic activities, and cross-talk with EGFR and HER-3. *Clin Cancer Res*. 2011;17:127–38.
- Moser C, Ruemmele P, Gehmert S, Schenk H, Kreutz MP, Mycielska ME, et al. STAT5b as molecular target in pancreatic cancer—inhibition of tumor growth, angiogenesis, and metastases. *Neoplasia*. 2012;14:915–25.
- Taeger J, Moser C, Hellerbrand C, Mycielska ME, Glockzin G, Schlitt HJ, et al. Targeting FGFR/PDGR/VEGFR impairs tumor growth, angiogenesis, and metastasis by effects on tumor cells, endothelial cells, and pericytes in pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther*. 2011;10:2157–67.
- Lang SA, Schachtschneider P, Moser C, Mori A, Hackl C, Gaumann A, et al. Dual targeting of Raf and VEGF receptor 2 reduces growth and metastasis of pancreatic cancer through direct effects on tumor cells, endothelial cells, and pericytes. *Mol Cancer Ther*. 2008;7:3509–18.
- Lang SA, Moser C, Gaumann A, Klein D, Glockzin G, Popp FC, et al. Targeting heat shock protein 90 in pancreatic cancer impairs insulin-like growth factor-I receptor signaling, disrupts an interleukin-6/signal-transducer and activator of transcription 3/hypoxia-inducible factor-1alpha autocrine loop, and reduces orthotopic tumor growth. *Clin Cancer Res*. 2007;13:6459–68.
- Lang SA, Moser C, Fichtner-Feigl S, Schachtschneider P, Hellerbrand C, Schmitz V, et al. Targeting heat-shock protein 90 improves efficacy of rapamycin in a model of hepatocellular carcinoma in mice. *Hepatology*. 2009;49:523–32.
- Giroux V, Malicet C, Barthet M, Gironella M, Archange C, Dagorn JC, et al. p8 is a new target of gemcitabine in pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2006;12:235–41.
- Michl P, Gress TM. Current concepts and novel targets in advanced pancreatic cancer. *Gut*. 2013;62:317–26.
- Lu Z, Kleeff J, Shrikhande S, Zimmermann T, Korc M, Friess H, et al. Expression of the multidrug-resistance 1 (MDR1) gene and prognosis in human pancreatic cancer. *Pancreas*. 2000;21:240–7.
- Zhou J, Liu M, Aneja R, Chandra R, Lage H, Joshi HC. Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in cancer cells by the c-Jun NH2-terminal kinase. *Cancer Res*. 2006;66:445–52.
- Neesse A, Michl P, Frese KK, Feig C, Cook N, Jacobetz MA, et al. Stromal biology and therapy in pancreatic cancer. *Gut*. 2011;60:861–8.
- Di Renzo MF, Poulsom R, Olivero M, Comoglio PM, Lemoine NR. Expression of the Met/hepatocyte growth factor receptor in human pancreatic cancer. *Cancer Res*. 1995;55:1129–38.
- Paciucci R, Vila MR, Adell T, Diaz VM, Tora M, Nakamura T, et al. Activation of the urokinase plasminogen activator/urokinase plasminogen activator

- receptor system and redistribution of E-cadherin are associated with hepatocyte growth factor-induced motility of pancreas tumor cells overexpressing Met. *Am J Pathol.* 1998;153:201–12.
28. Avan A, Caretti V, Funel N, Galvani E, Maftouh M, Honeywell RJ, et al. Crizotinib inhibits metabolic inactivation of gemcitabine in c-Met-driven pancreatic carcinoma. *Cancer Res.* 2013;73:6745–56.
 29. Christensen JG, Schreck R, Burrows J, Kuruganti P, Chan E, Le P, et al. A selective small molecule inhibitor of c-Met kinase inhibits c-Met-dependent phenotypes in vitro and exhibits cyto-reductive antitumor activity in vivo. *Cancer Res.* 2003;63:7345–55.
 30. Jin H, Yang R, Zheng Z, Romero M, Ross J, Bou-Reslan H, et al. MetMAB, the one-armed 5D5 anti-c-Met antibody, inhibits orthotopic pancreatic tumor growth and improves survival. *Cancer Res.* 2008;68:4360–8.
 31. Ucar DA, Magis AT, He DH, Lawrence NJ, Sebt SM, Kurenova E, et al. Inhibiting the interaction of cMET and IGF-1R with FAK effectively reduces growth of pancreatic cancer cells in vitro and in vivo. *Anticancer Agents Med Chem.* 2013;13:595–602.
 32. Ide T, Kitajima Y, Miyoshi A, Ohtsuka T, Mitsuno M, Ohtaka K, et al. The hypoxic environment in tumor-stromal cells accelerates pancreatic cancer progression via the activation of paracrine hepatocyte growth factor/c-Met signaling. *Ann Surg Oncol.* 2007;14:2600–7.
 33. Ying JE, Zhu LM, Liu BX. Developments in metastatic pancreatic cancer: is gemcitabine still the standard? *World J Gastroenterol.* 2012;18:736–45.
 34. Shah AN, Summy JM, Zhang J, Park SI, Parikh NU, Gallick GE. Development and characterization of gemcitabine-resistant pancreatic tumor cells. *Ann Surg Oncol.* 2007;14:3629–37.
 35. Li C, Wu JJ, Hynes M, Dosch J, Sarkar B, Welling TH, et al. c-Met is a marker of pancreatic cancer stem cells and therapeutic target. *Gastroenterology.* 2011;141:2218–27.
 36. Bentires-Alj M, Barbu V, Fillet M, Chariot A, Relic B, Jacobs N, et al. NF-kappaB transcription factor induces drug resistance through MDR1 expression in cancer cells. *Oncogene.* 2003;22:90–7.
 37. Zhang W, Chen H, Liu DL, Li H, Luo J, Zhang JH, et al. Emodin sensitizes the gemcitabine-resistant cell line Bxpc-3/Gem to gemcitabine via downregulation of NF-kappaB and its regulated targets. *Int J Oncol.* 2013;42:1189–96.
 38. Doublier S, Belisario DC, Polimeni M, Annaratone L, Riganti C, Allia E, et al. HIF-1 activation induces doxorubicin resistance in MCF7 3-D spheroids via P-glycoprotein expression: a potential model of the chemo-resistance of invasive micropapillary carcinoma of the breast. *BMC Cancer.* 2012;12:4.
 39. Matsumura A, Kubota T, Taiyoh H, Fujiwara H, Okamoto K, Ichikawa D, et al. HGF regulates VEGF expression via the c-Met receptor downstream pathways, PI3K/Akt, MAPK and STAT3, in CT26 murine cells. *Int J Oncol.* 2013;42:535–42.
 40. Ding Y, Cravero JD, Adrian K, Grippo P. Modeling pancreatic cancer in vivo: from xenograft and carcinogen-induced systems to genetically engineered mice. *Pancreas.* 2010;39:283–92.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

